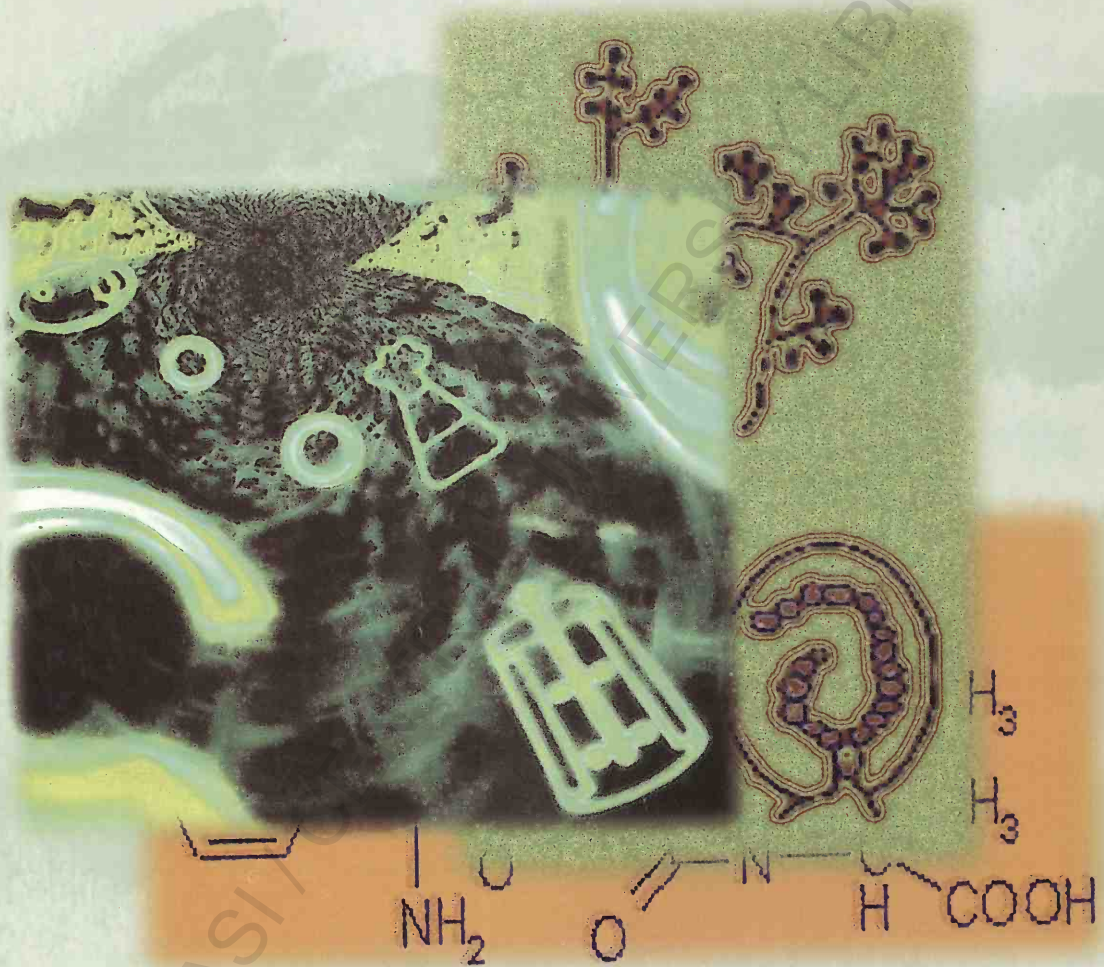
Ștefana JURCOANE
(coordonator)

Petruța CORNEA Ileana STOICA Tatiana VASSU

Universitaria



TRATAT DE BIOTEHNOLOGIE

VOL. II

C III-10.328

EDITURA TEHNICA

Colecția *UNIVERSITARIA* coordonator *Ștefana JURCOANE*

TRATAT DE BIOTEHNOLOGIE

Vol. II

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biotechnology

Recent developments in genetics and molecular biology have excited a world-wide interest in biotechnology.

Scientific breakthroughs in gene expression and protein engineering are being translated by a strengthening biotechnology industry into revolutionary new products and services.

The primary aim of this book is to present the principles of bioprocesses, in a way that is accessible to scientist.

The variety of bioprocesses industries is illustrated by typical examples. Also, the book contains aspects concerning the applications of genetic and molecular biology in biotechnology.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CM 10328

coordonator: Ştefana JURCOANE

Petruţa CORNEA
Ana ROŞU
Florentina ISRAEL
Radiana TAMBA
Viorica LUCHIAN
Ileana STOICA
Elena SĂSĂRMAN
Theodor VINTILĂ
Mirela BURCEA
Diana SMARANDACHE
Ciprian POPA
Tatiana VASSU
Veronica LAZĂR
Monica DRAGOMIRESCU
Laura DINU
Carmen BLOTESCU

TRATAT DE BIOTEHNOLOGIE

VOL. II

137830
B.C.U. - IASI

EDITURA TEHNICA

Bucureşti, 2006

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Copyright © 2006, S.C. Editura TEHNICĂ S.A.
Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate editurii.

Adresă: **S.C. Editura TEHNICĂ S.A.**
Str. Olari, nr. 23, sector 2
cod 024056
București, România

www.tehnica.ro

Referent științific
prof.univ.dr.dr.h.c. Alexandru Bogdan

coperta colecției
andrei**mănescu**

coordonator tehnic
floring**ealapu**

layout & pre-press
iuliana**panciu**

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
Tratat de biotehnologie/ Ștefana Jurcoane, Elena Săsărman, Irina Lupescu, ... - București: Editura Tehnică, 2004-
ISBN 973-31-2236-X
Vol. 1 - 2004 - Bibliogr. - ISBN 973-31-2235-1
Vol. 2 / Ștefana Jurcoane, Petruța Cornea, Tatiana Vassu, ..., 2006. - Bibliogr. - ISBN (10) 973-31-2279-3; ISBN (13) 978-973-31-2279-1
I. Jurcoane, Ștefana
II. Cornea, Petruța
III. Stoica, Ileana
IV. Vassu Tatiana
57:62(035)

Editat cu sprijinul Agenției Naționale pentru Cercetare Științifică

Tiraj: 500 exemplare
Preț editură: 12 RON

BCU CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

COLECTIV AUTORI

VOLUMUL II

Călina Petruța CORNEA
- Profesor universitar doctor, disciplinele: Genetică; Ingineria genetică
- Facultatea de Biotehnologii, USAMV – București
- Autoarea capitolelor 5 și 6

Ileana STOICA
- Conferențiar universitar doctor, disciplina: Genetica microorganismelor
- Facultatea de Biologie, Universitatea din București
- Coautoare la capitolele 1, 2, 3, 4

Tatiana VASSU DIMOV
- Profesor universitar doctor, disciplina: Genetică
- Facultatea de Biologie, Universitatea din București
- Coautoare la capitolele 1, 2, 3, 4

Ana ROȘU
- Conferențiar universitar doctor, disciplinele: Tehnologia culturilor de celule vegetale; Ameliorarea plantelor prin metode biotehnologice;
- Facultatea de Biotehnologii, USAMV – București
- Autoarea capitolului 7

Elena SĂSĂRMAN
- Cercetător științific principal I, doctor biolog
- Facultatea de Biologie, Universitatea din București
- Coautoare la capitolul 9

Veronica LAZĂR
- Profesor universitar doctor, disciplinele: Microbiologie, Imunologie
- Facultatea de Biologie, Universitatea din București
- Coautoare la capitolul 9

Ștefana JURCOANE
- Profesor universitar doctor, disciplinele: Biotehnologie generală, Biotehnologia enzimelor și proteinelor
- Facultatea de Biotehnologii, USAMV – București
- Coautoare la capitolele 9, 10

Radiana BEREHOIU TAMBA
- Lector universitar doctor, disciplina: Toxicologie
- Facultatea de Biotehnologii, USAMV – București
- Coautoarea capitolului 15

RCUB - CENTRUL UNIVERSITY LIBRARY

Florentina ISRAEL
- Lector universitar doctor, disciplina: Enzimologie
- Facultatea de Biotehnologii, USAMV – Bucureşti
- Autoarea capitolului 12

Monica DRAGOMIRESCU
- Lector universitar doctor, disciplina: Bioconversii enzimatice
- Facultatea de Zootehnie şi Biotehnologii, USAMVB – Timişoara
- Autoarea capitolului 11

Teodor VINTILĂ
- Lector universitar doctor, disciplinele: Tehnologia produselor de biosinteză, Microbiologie specială
- Facultatea de Zootehnie şi Biotehnologii, USAMVB – Timişoara
- Autorul capitolului 14.1, coautor la capitolul 10

Viorica LUCHIAN
- Lector universitar doctor, disciplinele: Legumicultura specială; Aplicaţii ale biotehnologiilor în legumicultură
- Facultatea de Horticultură, USAMV – Bucureşti
- Autoarea capitolului 14.2

Mirela BURCEA
- Conferenţiar universitar doctor, disciplina: Microbiologie generală
- Facultatea de Biotehnologii, USAMV – Bucureşti
- Autoarea capitolului 13

Carmen BALOTESCU
- Lector universitar doctor, disciplina: Microbiologie medicală
- Facultatea de Biologie, Universitatea din Bucureşti
- Coautoare la capitolul 9

Laura DINU
- Asistent universitar doctor, disciplinele: Microbiologie generală; Genetică
- Facultatea de Biotehnologii, USAMV – Bucureşti
- Autoarea capitolului 8

Diana SMARANDACHE
- Asistent universitar, disciplina Microbiologie
- Facultatea de Biologie, Universitatea din Bucureşti
- Coautoare la capitolul 9

Ciprian POPA
- Inginer biotehnolog drd. USAMV – Bucureşti, FARINSAN SA – Bucureşti
- Coautor la capitolul 15

BCU "LUCIAN BLAGA" UNIVERSITY LIBRARY

CUVÂNT ÎNAINTE

Lucrarea **Tratat de Biotehnologie** (vol. I şi vol. II) reprezintă o sinteză a principalelor aspecte ale biotehnologiilor moderne, completate cu date recente referitoare la metodele ingineriei genetice. Volumul II cuprinde atât noţiuni de bază din biologia şi genetica clasica, cât şi cele mai recente cunoştinte din domeniul biologiei moleculare, care fundamentează ***ştiinţele biotehnologice***.

În primul rând consider că este necesar să aducem un omagiu academic pentru regretatul **profesor universitar dr. docent I. F. Dumitru**, personalitate marcantă a Biochimiei româneşti, care a scris **Cuvânt înainte** la primul volum al acestui tratat, dând astfel un autentic gir profesional pentru confirmarea înaltelor valori ştiinţifice, tehnice şi didactice reprezentate de conţinutul volumului respectiv.

În al doilea rând, apariţia celui de-al doilea volum, la mai puţin de 2 ani de la lansarea primului volum (la care am avut onoarea să rostesc cuvântul de deschidere în luna Decembrie 2004, în cadrul Facultăţii de Biotehnologii Bucureşti) reprezintă în mod indubitabil o realizare de cel mai înalt prestigiu profesional.

În al treilea rând, în deplină cunoştintă de cauză, consider că doamna **prof.univ.dr. Ştefana Jurcoane**, strălucit colaborator al Institutului de Cercetări Chimico Farmaceutice Bucureşti şi mai târziu al Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară a Banatului, care este de mai mulţi ani titularul disciplinei de *Biotehnologii generale* din cadrul Facultăţii de Biotehnologii a Universităţii de Ştiinţe Agronomice şi Medicină Veterinară Bucureşti, este pe drept cuvânt o personalitate recunoscută, care reuşeşte să coordoneze elaborarea unui tratat de specialitate într-un domeniu prioritar cum este *Biotehnologia*.

Menţionez că, pe baza unei bogate experienţe profesionale atât a **coordonatorului** *prof.univ.dr.* **Ştefana Jurcoane,** cât şi a unor **colaboratori de seamă din domeniu**, dintre care amintim: *prof.univ.dr.* **Calina Petruţa Cornea,** *conf.dr.biol.* **Ana Rosu** (de la Facultatea de Biotehnologii, Bucureşti) *prof.univ.* **Tatiana Vassu,** *conf. dr.* **Ileana Stoica,** *dr.biol.* **Elena Săsărman** (de la **Facultatea de Biologie – Universitatea din Bucureşti**) etc. s-a realizat un foarte valoros tratat în domeniul Biotehnologiei şi Biologiei moleculare, cu certe elemente de originalitate, rezultate din activitatea laborioasă de cercetare ştiinţifică a autorilor.

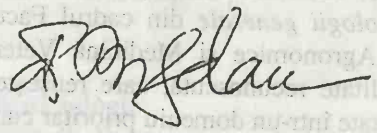
Este deja o realitate faptul că rezultatele spectaculoase obținute în ultimul timp în domeniul biologiei moleculare au pus bazele unor biotehnologii moderne cu impact economic şi social deosebit în viața cotidiană. Bioprocesele constituie partea esențială a unor procese specifice industriilor chimice, alimentare, farmaceutice şi agroalimentare, precum şi domeniilor medical veterinar, zootehnic, medicină umană.

Consider că apariția acestei lucrări marchează o etapă importantă în dezvoltarea învățământului biotehnologic în țara noastră, conducând la aprofundarea unor aspecte esențiale ale Biotehnologiei, prin aplicarea numeroaselor metode şi procedee noi, specifice biologiei moleculare şi biologiei celulare, care conduc la îmbunătățirea bioproceselor menționate.

Descoperirile ştiințifice din domeniul geneticii microorganismelor necesită o altfel de abordare a biotehnologiilor clasice; procesele de biosinteză, realizate cu ajutorul microorganismelor, au cunoscut un ritm rapid de dezvoltare datorită nevoilor tot mai mari ale omenirii de produse biologic active: aminoacizi, proteine, vitamine, antibiotice, produse agroalimentare şi furajere, enzime cu numeroase aplicații practice la nivel industrial etc., impunîndu-se obținerea acestora cu randamente cât mai mari, prin metode nepoluante. Astfel, tehnologia ADN-recombinant reprezintă o cale de rentabilizare a tuturor proceselor din ***industria biotehnologică*** prin transferul genelor de interes la microorganismele producătoare. Pe de altă parte, tehnicile de inginerie genetică permit obținerea de microorganisme capabile să metabolizeze deşeuri industriale din cele mai diverse, transformându-le în final în hrană şi energie.

În acest context, lucrarea de față, reprezintă sintetizarea aspectelor de bază implicate în procesele biotehnologice industriale, agroalimentare şi unele aspecte din domeniul medical veterinar.

Îmi exprim convingerea ca lucrarea va fi utilă nu numai studenților de la facultățile care au în structura lor profilul „Biotehnologie", ci şi specialiştilor dornici să aprofundeze cunoştințele noi din domeniile *biologiei moleculare*, *biotehnologiei* şi *bioingineriei*.



Prof. univ. dr. dr. h.c. **Alexandru BOGDAN**

– Membru corespondent al Academiei Române
– Preşedinte de onoare al Comisiei de Ştiinte Biotehnologice a A.S.A.S.

BCU IAŞI

CUPRINS

vol. II

PREFAȚĂ 17
Colectiv autori
Cuvânt înainte 19

Vol. I

Partea I. FUNDAMENTELE BIOTEHNOLOGIEI
Partea a II-a. TIPURI DE PROCESE BIOTEHNOLOGICE
Partea a III-a. BIOTEHNOLOGIA ENZIMELOR
Partea a IV-a. IMPLICAȚII ALE BIOTEHNOLOGIEI ÎN ALTE DOMENII

Vol. II

Partea a V-a. GENETICA MOLECULARĂ 19

1. Genetica clasică 19
1.1. Istoricul cercetărilor de genetică 21
1.2. Legile Mendeliene ale eredității 22
1.2.1. Noțiuni de bază în genetica clasică 23
1.2.2. Prima lege a eredității 25
1.2.3. A doua lege a lui Mendel 26
1.2.4. A treia lege a lui Mendel 26
1.2.5. Variații de la modelul de dominanță – recesivitate 27
1.2.6. Serii polialelice 28
1.2.7. Caractere poligenice 28
1.3. Teoria cromozomială a eredității 29
1.3.1. Musculița-de-oțet 30
1.3.2. Tezele teoriei cromozomiale a eredității 30
1.3.3. Determinismul cromozomial al sexelor 32
1.4. Definirea genei

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
CHIMIE

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. Structura acizilor nucleici **34**
2.1. Introducere 34
2.2. Structura primară a acizilor nucleici 35
2.3. Structura secundară a acizilor nucleici 37
2.4. ADN – „elicea vieții" 39
2.5. Suprarăsucirea moleculelor de ADN 42
2.6. Acizii ribonucleici 42
3. Cromozomul la organisme pro- şi eucariote **45**
3.1. Cromozomul bacterian 45
3.1.1. Dimensiune 45
3.1.2. Modelul Pettijohn 46
3.1.3. Configurații ADN în cromozomul bacterian 46
3.1.4. Compoziția în nucleotide 46
3.1.5. Proteine asociate cu cromozomul bacterian 48
3.1.6. Secvențe ADN repetate 50
3.1.7. Numărul de copii genice 52
3.1.8. Densitatea informației în cromozomul bacterian 52
3.1.9. Redundanța genelor şi a produselor genetice 54
3.1.10. Situsuri de inserție fagică în cromozomul bacterian 54
3.1.11. Localizarea cromozomală a genelor înrudite fiziologic 55
3.2. Plasmide bacteriene 56
3.2.1. Principalele categorii de gene codificate de plasmide 56
3.2.2. Clasificarea plasmidelor 58
3.3. Structura cromozomului la eucariote 60
3.3.1. Clase de secvențe ADN la eucariote 62
3.3.2. Proteinele cromozomale 62
3.3.3. Nivelele de organizare ale cromatinei 63
4. Funcțiile materialului genetic **65**
4.1. Replicarea ADN 65
4.1.1. Principalele etape ale replicării ADN 65
4.1.2. Enzimologia replicării cromozomului bacterian 69
4.1.3. Replicarea plasmidelor bacteriene 75
4.2. Transcrierea genetică 83
4.2.1. Principii şi definiții 83
4.2.2. Enzime 85
4.2.3. Transcrierea la procariote 85
4.2.4. Transcrierea la eucariote 89
5. Genetica microorganismelor **93**
5.1. Genomul bacterian 93
5.1.1. Reglarea activității genelor 97
5.2. Genomul microorganismelor eucariote 102
5.2.1. Genomul levurilor 102
5.2.2. Genomul fungilor filamentoşi 107
5.3. Mutațiile şi mutageneza 111

5.4. Recombinarea genetică la microorganisme 122
5.5. Recombinarea genetică prin fuziunea de protoplaşti 134
5.5.1. Izolarea protoplaştilor 134
5.5.2. Reversia protoplaştilor 139
5.5.3. Fuziunea protoplaştilor 141
6. Tehnologia ADN recombinant – etape aplicaţii 145
6.1. Sisteme biologice utilizate în tehnologia ADN recombinant 146
6.2. Etapele tehnologiei ADN recombinant 153
6.3. Manipularea exprimării genelor de interes în sistem procariot 185
6.3.1. Exprimarea genelor prin utilizarea unui promotor reglabil şi puternic 186
6.3.2. Obţinerea proteinelor de fuziune 191
6.3.3. Mărirea numărului de copii a genelor de interes 194
6.3.4. Vectori de traducere 195
6.3.5. Creşterea stabilităţii proteinelor heterologe 196
6.3.6. Împachetarea proteinelor 197
6.3.7. Limitarea oxigenului 198
6.3.8. Stabilizarea genelor clonate prin integrarea în ADN cromozomal al gazdei 199
6.3.9. Îmbunătăţirea secreţiei proteinelor heterologe 202
6.3.10. Utilizarea formelor L drept gazde pentru clonare 203
6.4. Manipularea exprimării genelor de interes în sistem eucariot 204
6.4.1. Strategii de clonare în levuri 205
6.4.2. Strategii de clonare în celule animale 214
6.5. Aplicaţii practice ale microorganismelor recombinate 236
7. Progrese în ingineria genetică vegetală 245
7.1. Strategii generale în transgeneza vegetală 245
7.1.1. Transformarea genetică prin intermediul vectorilor 247
7.1.2. Metode fizice de transfer genic 267
7.2. Tehnici transgenice pentru producerea de compuşi fitochimici cu utilizări terapeutice şi industriale 269
7.2.1. Culturile de rădăcini ca model experimental 269
7.2.2. Abordări curente şi perspective în ingineria metabolică vegetală 276
8. Ingineria genetică a halotoleranţei la plante 301
8.1. Mecanismul toleranţei la stresul salin în plante şi microorganisme 301
8.1.1. Halotoleranţa – strategia compuşilor osmoreglatori şi homeostazia ionilor 302
8.1.2. Răspunsul biologic la stresul salin 305
8.2. Sisteme-model de investigare a mecanismelor care asigură toleranţa la stresul sării 309
8.2.1. Modelul procariot 310
8.2.2. Modelul eucariot 312
8.2.3 Diversitatea fenotipică în toleranţa la stresul sării 314

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8.3. Importanța utilizării modelelor microbiene pentru ameliorarea toleranței plantelor la salinitate 331
8.3.1. Transferul genelor implicate în biosinteza prolinei 334
8.3.2. Transferul genelor implicate în biosinteza trimetilglicinei 336
8.3.3. Transferul genelor implicate în biosinteza trehalozei 338
8.3.4. Transferul genelor implicate în homeostazia ionilor 341
8.4. Ingineria genetică a halotoleranței la plante – concluzii și perspective 341

Partea a VI-a. APLICAȚII ALE BIOTEHNOLOGIEI ÎN DIFERITE DOMENII 345

9. Probiotice 347
9.1. Generalități asupra probioticelor 347
9.1.1. Mecanismul de acțiune 348
9.1.2. Caracteristicele probioticelor 349
9.1.3. Necesități nutriționale ale bacteriilor lactice de tip probiotic 351
9.2. Tehnologia probioticelor 352
9.2.1. Generalități 352
9.2.2. Conservarea bacteriilor lactice și reluarea lor în procesele biotehnologice 353
9.2.3. Conservarea microorganismelor producătoare 353
9.2.4. Prepararea culturilor starter (inocul) 354
9.2.5. Caracteristicile fermentării laptelui cu tulpini de tip probiotic 354
9.2.6. Prepararea și caracteristicile culturilor starter 354
9.2.7. Fermentația 355
9.2.8. Evaluarea viabilității culturilor 355
9.3. Produse lactate fermentate 356
9.3.1. Cultură probiotică cu tulpină unică 356
9.3.2. Combinații de culturi probiotice cu tulpini suport 356
9.3.3. Proprietăți tehnologice și organoleptice ale produsului lactic fermentat 356
9.3.4. Caracteristicele produselor lactate fermentate de tip probiotic 357
9.3.5. Viabilitatea probioticelor 358
9.3.6. Stabilitatea probioticelor în prezența prebioticelor 359
9.3.7. Tehnologia obținerii pe scară industrială a probioticelor 359
9.4. Evaluarea probioticelor în hrană 362
9.4.1. Gen, specie, tulpină 362
9.4.2. Teste *in vitro* pentru selecția probioticelor 364
9.4.3. Condițiile impuse pentru siguranța și puritatea tulpinilor probiotice 364
9.4.4. Studii *in vivo* pe aniamale și oameni 365
9.4.5. Recomandări privind starea de sănătate și etichetarea probioticului 366

9.5. Posibilităţi de creştere a eficienţei preparatelor probiotice 367
9.5.1. Probiotice şi prebiotice 368
9.5.2. Probiotice potenţate 369
9.5.3. Probiotice şi fitocompuşi 369
9.5.4. Probiotice şi substrate nespecifice 370
9.5.5. Probiotice şi metaboliti ai microorganismelor 370
9.5.6. Probiotice şi antibiotice 371
9.5.7. Probiotice şi vaccinuri 371
9.5.8. Probiotice şi microelemente 372
9.5.9. Manipularea genetică 372
9.6. Probiotice uz zootehnic 373
9.6.1. Scurt istoric al obţinerii preparatelor de uz zootehnic 373
9.6.2. Microbiota tractului digestiv la animale 374
9.6.3. Caracteristicile probioticelor de uz zootehnic 381
9.7. Probiotice de uz Medical 389
9.7.1. Probiotice pentru nou-născuţi şi copii 389
9.7.2. Mecanismele prin care probioticele reduc durata şi efectele diareei 391
9.7.3. Gastroenteritele bacteriene 392
9.7.4. Infecţia cu *Helicobacter pylori* şi complicaţiile acesteia 392
9.7.5. Cancerul 393
9.7.6. Imunitatea mucoasei 393
9.7.7. Alergii 394
9.7.8. Aparatul reproducator şi sănătatea vezicii urinare 394
9.7.9. Probiotice utilizate în infecţii chirurgicale 395
9.8. Metode de studiu *in vitro* şi *in vivo* al eficienţei probioticelor şi a unor substanţe cu caracter prebiotic 396
9.8.1. Metode de studiu *in vitro* al eficienţei probioticelor sau preparatelor prebiotice 400
9.8.2. Metode de studiu *in vivo* al eficienţei probioticelor sau preparatelor prebiotice 406
9.8.3. Studiul siguranţei administrării probioticelor din punct de vedere al riscului de transmitere a unor gene de rezistenţă la antibiotice 410
10. Produse biotehnologice utilizate în nutriţia animală 414
10.1 Inoculanţi pentru siloz 414
10.1.1. Însilozarea şi dificultătile sale 414
10.1.2. Conditiile unei insilozari reusite 415
10.1.3. Bacteriile lactice şi procesul de însilozare; evoluţia sezonieră a bacteriilor lactice epifite 416
10.1.4. Utilizarea de adaosuri pentru insilozare 417
10.1.5. Enzime folosite în procesul de insilozare 418
10.1.6. Efectele complexului enzimatic celulozolitic asupra furajului 421
10.2. Produse cu efect probiotic 423

BCU "ION CREANGĂ" UNIVERSITY LIBRARY

10.2.1. Compoziţia şi rolul florei intestinale 424
10.2.2. Variaţiile florei intestinale 424
10.2.3. Microorganisme utilizate în produse cu efect probiotic 426
10.2.4. Conditionarea produselor cu efect probiotic; obţinerea preparatului comercial 428
10.2.5. Prezentarea probioticului şi condiţii de păstrare 429
10.3. Drojdii furajere 430
10.3.1. Efectele culturilor de drojdie în producţiile animale 431
10.3.2. Efectele culturilor de drojdie asupra rumenului 432
10.3.3. Bazele biochimice care explică efectele stimulatorii ale drojdiei în rumen 436
10.3.4. Efectele culturilor de drojdie în alte zone ale tractului digestiv 437
10.3.5. Alte activităţi potenţiale ale culturilor de drojdie în sistemele de creştere a animalelor 438
11. Aplicaţii biotehnologice ale enzimelor proteolitice microbiene 439
11.1. Aplicaţii ale proteazelor libere şi imobilizate 439
11.2. Reacţii catalizate de proteaze în mediu apos şi organic 443
11.2.1. Generalităţi 443
11.2.2. Reacţii catalizate de proteaze în mediul apos 445
11.2.3. Reacţii catalizate de proteaze în solvenţi organici 448
11.3. Obţinere de aminoacizi optic activi cu ajutorul enzimelor 470
11.4. Sinteze enzimatice de peptide 481
11.5. Reacţii catalizate de proteaze în sinteza unor medicamente 488
11.6. Uilizarea enzimelor proteolitice în industria detergenţilor 494
11.7. Utilizarea proteazelor în industria alimentară 496
11.8. Utilizarea proteazelor în hrana animală 500
12. Conversia materialelor lignocelulozice prin hidroliza enzimatică şi fermentaţie 503
12.1. Componentele biomasei de natură lignocelulozică şi structura lor 503
12.1.1. Celuloza 503
12.1.2. Hemicelulozele 510
12.1.3. Lignina 511
12.1.4. Materiile pectice 512
12.1.5. Subproduse şi deşeuri agroalimentare de natură lignocelulozica 513
12.2. Sistemul polienzimatic celulazic 515
12.2.1. Componentele sistemului celulazic 515
12.2.2. Specificitatea de substrat a celulazelor 516
12.2.3. Adsorbţia celulazelor la suprafeţele celulozei 517
12.2.4. Sinergismul dintre componentele sistemului celulazic 519
12.2.5. Aspecte ale mecanismului general de degradare a elulozei 521
12.3. Pretratamente aplicate materialelor lignocelulozice 524
12.3.1. Pretratamente mecanice 524

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

12.3.2. Pretratamente fizice 526
12.3.3. Pretratamente chimice 526
12.3.4. Pretratamente biologice 529
12.3.5. Pretratamente combinate 530
12.4. Degraradarea microbiană a materialelor lignocelulozice 531
12.4.1. Microorganisme implicate în degradarea materialelor lignocelulozice 531
12.4.2. Degradarea celulozei cu tulpini de *Trichoderma viride* 533
12.4.3. Culturi mixte 536
12.4.4. Valorificarea unor materiale lignocelulozice prin bioconversie 537
13. Biotehnologii agroalimentare 540
13.1. Biotehnologii clasice fermentative 540
13.1.1. Produsele lactate 540
13.1.2. Produsele fermentate de origine vegetală 546
14. Aplicații ale biotehnologiilor în agricultură 571
14.1. Inocularea leguminoaselor cu culturi de Rhizobium 571
14.1.1. Macrosimbiontul – leguminoasele 574
14.1.2. Obținerea inoculanului 578
14.1.3. Selecția tulpinilor folosite la inoculare 578
14.1.4. Multiplicarea bacteriilor fixatoare de azot 579
14.1.5. Excipienti sau suporturi pentru inoculanti cu *Rhizobium* 580
14.1.6. Prepararea produsului finit 582
14.1.7. Testarea si aplicarea unui inoculant 582
14.1.8. Factorii care afecteaza raspunsul la inoculare 584
14.1.9. Cantitatea de azot fixat de diferite leguminoase 589
14.2. Agricultura biologică – un viitor sănătos 589
14.2.1. Scurt istoric 589
14.2.2. Situația actuală a agriculturii biologice 594
14.2.3. Agricultura biologică în fermele legumicole 599
15. Toxicologia în biotehnologii 626
15.1. Noțiuni de toxicologie biotehnologică moleculară 627
15.1.1. Agenți toxici mutageni și carcinogeni 627
15.1.2. Toxicologia organismelor modificate genetic 641
15.2. Toxicologie biotehnologică agricolă 652
15.2.1. Aspecte toxice asociate biotehnologiilor vegetale 652
15.2.2. Aspecte toxice asociate biotehnologiilor zootehnice 680
15.3. Toxicologie biotehnologică industrială 688
15.3.1. Toxinele microorganismelor industriale. Structură și metabolizare 689
15.3.2. Aspecte toxicologice privind radicalii liberi și efectele radiațiilor utilizate la conservarea produselor alimentare 704
15.3.3. Intermediari toxici ai reacției Maillard 708
15.3.4. Alcaloizi toxici în alimente 712

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

15.4. Toxicologie biotehnologică medicală şi medical-veterinară 714
15.4.1. Toxicologia proteinelor prionice 714
15.4.2. Implicaţii biotehnologice ale prionilor 718
15.4.3. Aspecte toxicologice şi toxicogenetice ale consumului de medicamente 719
15.4.4. Toxicitatea alcaloizilor 729

BIBLIOGRAFIE *740*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Partea a V-a

GENETICA MOLECULARĂ

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- **Genetica clasică**
- **Structura acizilor nucleici**
- **Cromozomul la organisme pro- şi eucariote**
- **Funcţiile materialului genetic**
- **Genetica microorganismelor**
- **Tehnologia ADN recombinant – etape, aplicaţii**
- **Progrese în ingineria genetică vegetală**
- **Ingineria genetică a halotoleranţei la plante**

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. GENETICA CLASICĂ

1.1. ISTORICUL CERCETĂRILOR DE GENETICĂ

Genetica este ştiinţa care studiază structura şi funcţiile genelor şi transmiterea lor la descendenţi. Începuturile geneticii se înscriu cu 4000 de ani în urmă, prin studiile realizate în Sumer şi Egipt, concretizate printr-o selecţie primitivă a caracterelor pe bază de fenotipuri avantajoase pentru amelioratori.

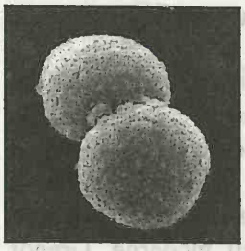
Genetica modernă a debutat la mijlocul secolului al XIX-lea cu studiile lui **Gregor Mendel** care a analizat transmiterea caracterelor la *Pisum sativum* (mazărea) şi a stabilit că anumite caracter pot fi transmise la descendenţi realizând o corelaţie între caractere şi „factorii ereditari". Astfel a început „genetica formală" – genetica transmiterii caracterelor. Cunoscut ca părintele geneticii moderne, Gregor Mendel (1822-1884) s-a născut în 1822 într-o familie de ţărani din Heizendorf (localitatea făcea parte din Austria la vremea respectivă; astăzi însă, localitatea se numeşte Hynčice şi face parte din Republica Cehă). La vârsta de 21 de ani intră în Mânăstirea Augustiniană din Brünn (astăzi Brno) unde ulterior devine călugăr. A urmat cursuri de matematică, ştiinţă, filozofie la Universitatea din Viena. În grădina mânăstirii din Brno, Mendel a realizat timp de zece ani experimente de incrucişări între diverse soiuri de mazăre, urmărind transmiterea a şapte perechi de caractere ereditare la descendenţi. Interpretând rezultatele, Mendel a elaborat principiile eredităţii cunoscute astăzi sub denumirea de "***Legile lui Mendel***". Şi-a publicat cea mai importantă lucrare despre ereditate în 1866, dar de-abia în 1900 cunoscutul botanist olandez Hugo de Vries a apreciat munca şi activitatea lui Mendel.

Gregor Johann Mendel

Întreaga semnificaţie a fost realizată de-abia în anii 1920-1930, prin efervescenţa experimentală a altui mare genetician, Thomas Hunt Morgan, care a elaborat teoria cromozomală a eredităţii şi a denumit acei factori ereditari – **gene**.

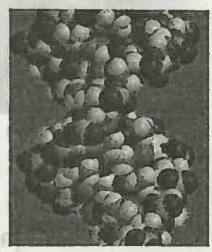
Morgan este cel care a fundamentat **citogenetica**, ştiinţă ce studiază structura şi numărul cromozomilor, precum şi comportamentul lor în timpul diviziunii celulare (mitoză şi meioză). Thomas Hunt Morgan (1866-1945) s-a născut în Kentucky, SUA şi a fost profesor de zoologie experimentală la Universitatea Columbia între 1904 şi 1928. Împreună cu doctoranzii săi (A.H.Sturtevant, C.B.Bridges şi H.J.Muller), Morgan a realizat experimente şi analize citologice pe musculiţa-de-oţet (*Drosophila melanogaster*) demonstrând faptul că cromozomii se comportă foarte asemnănător cu ceea ce Mendel denumea "factori ereditari". Toate rezultatele l-au condus pe Thomas Morgan la elaborarea ***Teoriei cromozomiale a eredităţii*** şi la publicarea lucrării "Mecanismele Eredităţii Mendeliene" (1915), lucrare ce a avut un rol foarte important în dezvoltarea geneticii moderne. Experimentele ulterioare realizate de Morgan au demonstrat existenţa şi comportamentul genelor, rezultate publicate sub titlul "Teoria Genei" (1926). Pentru întreaga sa activitate ştiinţifică, Thomas Morgan primeşte în 1933 Premiul Nobel pentru fiziologie şi medicină.

Thomas Hunt Morgan

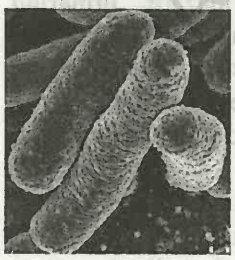


Streptococcus pneumoniae

Genetica moleculară debutează cu studiile lui Griffith (1928) care a urmărit procesul de virulenţă la pneumococi (bacterii ce provoacă pneumonie la om şi mamifere). Griffith a costatat că pneumococi nevirulenţi devin infecţioşi în prezenţa unor penumococi virulenţi dar omorâţi anterior prin tratament termic. A concluzionat că modificarea se relizează prin acţiunea unui agent transformant. Natura acestui agent însă a fost descoperită mai târziu, în 1944, de către Avery, Mac Leod şi McCarty, fiind vorba de o macromoleculă de ADN d.c. Acizii nucleici au fost iniţial descoperiţi în nucleii leucocitelor umane, dar fără să fie identificată funcţia lor. Analiza chimică realizată în prima decadă a secolului trecut a stabilit existenţa a 2 clase importante de acizi nucleici, şi anume ADN şi ARN.



Până în prezent, cea mai importantă descoperire din domeniul geneticii a fost elucidarea structurii ADN, macromoleculă dublu catenară helicală, de către James Watson şi Francis Crick în 1953. În prezent, ADN este denumită macromoleculă informaţională, conţinând informaţia genetică codificată în structura sa.



Escherichia coli

Etapa următoare in dezvoltarea geneticii este rezentată de apariţia geneticii moleculare care a beneficiat pe studiile pe microorganisme, iniţial pe bacterii, iar „cobaiul" a fost *Escherichia coli*. Acest microorganism prezintă avantaje

majore pentru studiile de genetică: o generație se obține în câteva minute, toate caracterele se exprimă (datorită faptului că este haploidă, adică deține un singur set de gene/cromozomi), populația reprezintă o clonă (toți indivizii fiind identici din punct de vedere genetic, iar variabilitatea intervine doar în urma unor procese mutagene).

O altă etapă care a revoluționat genetica moleculară este reprezentată de momentul inițierii tehnologiei ADN recombinant în 1970, tehnologie ce a permis realizarea unor cercetări fundamentale referitoare la structura și funcțiile genelor și a unor cercetări aplicative ce au condus la sinteza unor substanțe biologic active, inclusiv a unor compuși de interes biomedical.

Tot anul 1970 este anul în care Temin și Baltimore au descoperit retrovirusurile și reverstranscrierea.

Anul 1975 este asociat cu hibridizarea moleculară de tip *Southern, Northern și Western blotting*, fapt ce a permis seturi de analize moleculare a structurii fine a genelor.

Anul 1977 este corelat cu secvențierea acizilor nucleici, Maxam, Gilbert și Sanger, precum și cu identificarea genelor mozaicate de la organismele eucariote.

Perioda următoare a geneticii moleculare este cea a anilor 1980 – 1985, când au fost obținute primele organisme transgenice, organisme obținute prin introducerea de gene heterologe (gene obținute de la alte organisme) în embrioni timpurii aflați în stare de blastulă.

Etapa următoare corespunde anului 1975, an în care Kary Mullis a pus la punct tehnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de amplificare enzimatică *in vitro* a unei secvențe de ADN, tehnică esențială în studierea și secvențierea genelor pentru că permite obținerea unui număr mare de copii dintr-o anumită secevnță de nucleotide într-un timp foarte scurt.

În anul 1996, cercetătorii de la Institutul Roslin din Edinburg, Marea Britanie au reușit clonarea unui organism mamalian pornind de la celule somatice adulte. De atunci și până în prezent s-a mai reușit clonarea unor diverse specii de mamifere.

1.2. LEGILE MENDELIENE ALE EREDITĂȚII

La mijlocul secolului XIX Gregor Johann Mendel a efectuat o serie de experimente pe plante de mazăre, în grădina mânăstirii din Brno. El a ales mazărea de grădină (*Pisum sativum*), în primul rând pentru că această plantă se poate și autofertiliza datorită faptului că pe o aceeași tulpină există și flori femele și flori mascule.

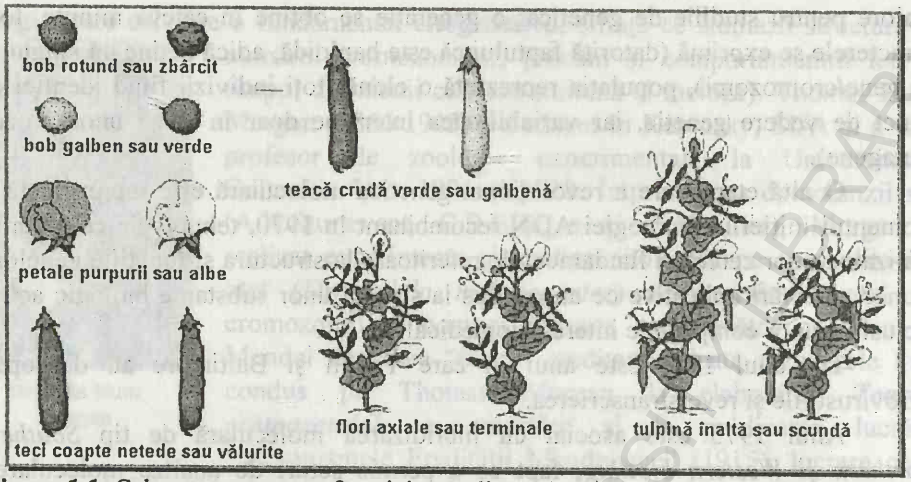


Figura 1.1 Cele şapte caractere fenotipice analizate de Gregor Mendel la *Pisum sativum* (după Singer, 1978)

Mendel a încrucişat diverse soiuri de mazăre, urmărind în descendenţă şapte caractere (Figura 1), dintre care cele mai cunoscute sunt forma şi, respectiv, culoarea bobului. Pentru fiecare din cele două caractere, Mendel a constatat că pot exista două variante:

Caracter	Variante
forma bobului	neted
	zbârcit
culoarea bobului	galben
	verde

În cursul încrucişărilor pe care le-a realizat, Mendel a notat:
P sau **F0** – generaţia parentală, pură din punct de vedere genetic
F1 – prima generaţie, obţinută din încrucişarea dintre 2 linii parentale pure
F2 – a doua generaţie, obţinută prin autofecundarea indivizilor din prima generaţie

1.2.1. Noţiuni de bază în genetica clasică

Din experimentele efectuate de Gregor Mendel, au reieşit următoarele noţiuni ce sunt în bună parte valabile şi astăzi:

- **gene alele** (denumite de Mendel „*factori ereditari*") sunt variante ale unei gene, variante ce codifică pentru un acelaşi caracter şi care sunt localizate în loci omologi
- într-un organism diploid, un caracter este determinat de o pereche de gene alele; acestea pot să fie identice una cu cealaltă, caz în care organismul

poartă denumirea de **homozigot** pentru acea genă, sau pot sa fie diferite una de cealaltă, caz în care organismul se numeşte **heterozigot**

- într-o pereche de gene alele prezente într-un organism, de cele mai multe ori, nu se exprimă ambele gene, ci doar una dintre ele; gena care se exprimă este denumită ca fiind **dominantă** faţă de cealaltă, care este denumită **recesivă**
- ca urmare, organismele heterozigote prezintă acelaşi fenotip cu organismele homozigote dominante
- perechile de gene alele prezente într-un organism se despart in interiorul gameţilor, aceştia având doar câte una din gene din fiecare pereche
- **loci omologi** reprezintă locaţii situate la acelaşi nivel pe cromozomi omologi, locaţii în care se găsesc gene alele
- linie pură din punct de vedere genetic care este homozigot pentru o serie de caractere
- **genotipul** reprezintă totalitatea genelor deţinute de un organism
- **fenotipul** reprezintă totalitatea caracterelor „arătate" (prezentate) de un organism

Mendel a mai notat:

A - genă dominantă
a – genă recesivă
AA – organism cu genotip homozigot dominant; un asemenea organism exprimă fenotipul genei *A*
aa - organism cu genotip homozigot recesiv; un asemenea organism exprimă fenotipul genei *a*
Aa – organism cu genotip heterozigot; un asemenea organism exprimă fenotipul genei *A*

1.2.2. Prima lege a eredităţii

Legile mendeliene descriu transmiterea caracterelor prin intermediul „factorilor ereditari".

Prima lege a lui Mendel este intitulată ***Legea purităţii gameţilor*** şi statuează faptul că gameţii sunt puri din punct de vedere genetic, adică nu conţin decît unul din cei 2 factori ereditari pereche. Această lege mai este denumită şi **monohibridism**, întru-cât descrie încrucişarea între organisme ce diferă între ele doar printr-un singur caracter, situaţie în care descendenţa este uniformă fenotipic şi se aseamănă cu unul din parentali.

Pentru evidențierea acestei legi, Mendel a încrucișat 2 linii pure de mazăre: una cu bob neted (pe care a notat-o AA) și una cu bob zbârcit (aa).

Dacă se încrucișează 2 organisme homozigote pentru un caracter (AA x aa), organisme ce diferă între ele printr-un singur caracter, în prima generație (F1) rezultă numai organisme care din punct de vedere genotipic sunt heterozigote, iar din punct de vedere fenotipic prezintă fenotipul genei dominante (în cazul de față A adică bob neted. Prin autofertilizarea organismelor obținute în această primă generație, se obțin în generația a doua (F2) organisme ce diferă între ele atât genotipic cât și fenotipic:

- homozigote dominante (AA)
- homozigote recesive (aa)
- heterozigote (Aa)

În urma interpretătilor statistice, s-a constatat că genotipurile și fenotipurile segregă după anumite reguli statistice:

- cele 3 genotipuri posibile respecă anumite proporții: 1AA : 2Aa : 1aa;
- cele 2 fenotipuri posibile respectă anumite proporții: 3 fenotipul genei dominante: 1 fenotipul genei recesive (Figurile 1.2 și 1.3).

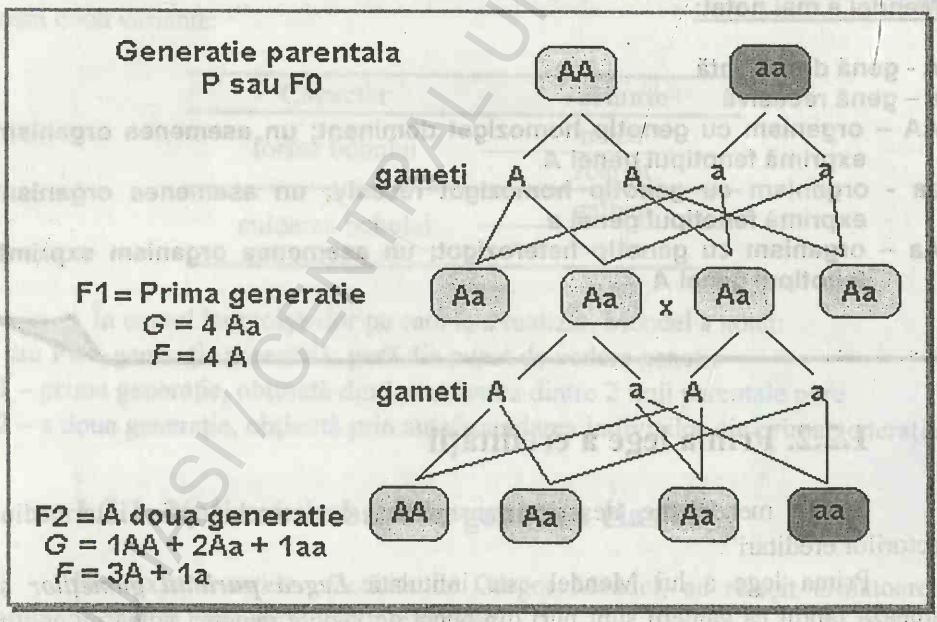


Figura 1.2 Prezentarea schematizată a monohibridării prin încrucișarea la *Pisum sativum* între plante cu bob galben (caracter dominant codificat de gena A) și plante cu bob verde (caracter recesiv codificat de gena a).

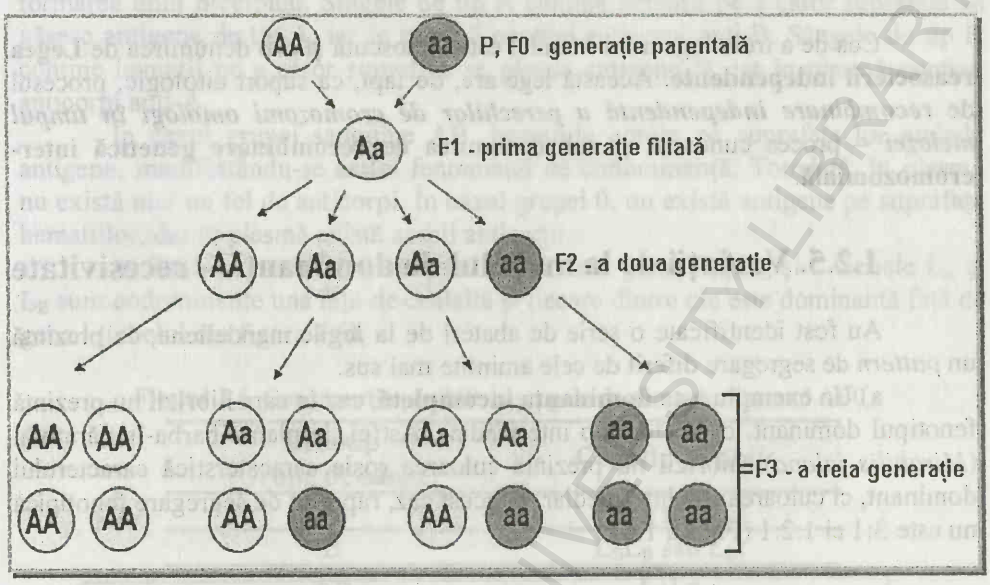


Figura 1.3 Schema segregării genotipice şi fenotipice, de la generația parentală până la generația a treia, în cazul unei singure perechi de caractere.

1.2.3. A doua lege a lui Mendel

A doua lege a lui Mendel se mai numeşte şi **dihibridism** şi presupune încrucişarea a 2 organisme ce diferă între ele doar prin 2 caractere. Această lege mai poartă numele şi de ***Legea segregării independente a caracterelor*** şi statuează faptul că fiecare pereche de caractere se transmite la descendenți în mod independent de alte perechi de caractere. În experimentele sale Mendel a luat în studiu plante de mazăre cu bob neted şi galben (caractere dominante) şi plante cu bob zbârcit şi verde (caractere recesive). În prima generație (F1) s-au obținut plante hibride care fenotipic exprimau caracterele dominante (bob neted şi galben). În urma autofertilizării plantelor din prima generație, în a doua generație s-a obținut o segregare fenotipică de 9:3:3:1 (tabelul din figura 1.4).

Figura 1.4 Reprezentarea schematizată a segregării caracterelor în a doua generație (F2) prin dihibridism.

gameți femeli gameți masculi	AB	Ab	aB	ab
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

1.2.4. A treia lege a lui Mendel

Cea de a treia lege a lui Mendel este cunoscută şi sub denumirea de **Legea reasocierii independente**. Această lege are, de fapt, ca suport citologic, procesul de ***recombinare independentă a perechilor de cromozomi omologi în timpul meiozei*** – proces cunoscut şi sub denumirea de **recombinare genetică inter-cromozomială**.

1.2.5. Variaţii de la modelul de dominanţă – recesivitate

Au fost identificate o serie de abateri de la legile mendeliene, ce prezintă un *pattern* de segregare diferit de cele amintite mai sus.

a) Un exemplu este **dominanţa incompletă**, caz în care hibrizii nu prezintă fenotipul dominant, ci un fenotip intermediar. Astfel, la planta barba-împăratului (*Mirabilis jalapa*), hibrizii nu prezintă culoarea roşie caracaterstică caracterului dominant, ci culoarea roz intermediar. În acest caz, raportul de segregare fenotipică nu este 3:1 ci 1:2:1 (Figura 1.5).

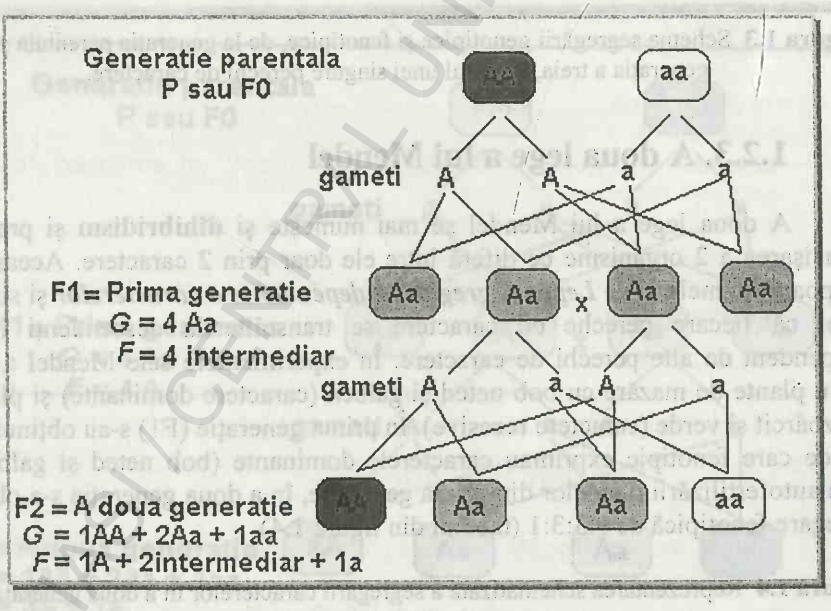


Figura 1.5 Prezentarea schematizată a monohibridării prin încrucişarea la *Mirabilis jalapa* între plante cu flori roşii (caracter dominant codificat de gena A) şi plante cu flori albe (caracter recesiv codificat de gena a).

b) O altă abatere este **codominanţa**, care este cel mai evident în cazul grupelor de sânge de la om din sistemul ABO.

Sistemul ABO presupune existenţa unor anticorpi faţă de polizaharidele celulare A sau B. Un anticorp este o proteină ce are capacitatea de a lega un

antigen (moleculă străină de corp) şi a o inactiva. Inactivarea este însoţită de formarea unui precipitat. Sîngele de tip A conţine hematii pe a căror suprafaţă se găsesc antigene de tip A, iar în plasmă conţine anticorpi anti-B. Sângele de tip B conţine hematii pe a căror suprafaţă se găsesc antigene B, iar în plasmă conţine anticorpi anti-A.

In cazul grupei sanguine AB, hematiile conţin pe suprafaţa lor ambele antigene, manifestându-se astfel fenomenul de codominanţă. Totodată, în plasmă nu există nici un fel de anticorpi. În cazul grupei 0, nu există antigene pe suprafaţa hematiilor, dar în plasmă există ambii anticorpi.

In final, s-a stabilit că sistemul cuprinde 3 gene, L_A, L_B şi l. Genele L_A şi L_B sunt codominante una faţă de cealaltă şi fiecare dintre ele este dominantă faţă de gena l (tabelul din figura 1.6).

Figura 1.6 Genotipurile posibile la grupele de sânge în sistemul AB0.

Fenotip (Grupa de sânge)	Genotip posibil
A	L_AL_A sau L_Al
B	L_BL_B sau L_Bl
AB	L_AL_B
0	ll

Antigenele AB0 de pe suprafaţa hematiilor sunt glicoproteine ce se formează de la un precursor poplipeptidic la care se adaugă, în funcţie de grupa sanguină, diverse lanţuri polizaharidice. Glicozilarea este realizată de o enzimă diferită la grupele La şi Lb. În cazul grupei 0, alela recesivă l codifică pentru o enzimă inactivă care determină ca antigenul să fie format din miezul polipeptidic şi fucoză. Pentru grupa A transferaza A catalizează legarea la fucoză a N-acetil-glucozaminei, iar pentru grupa β – galactoza.

1.2.6. Serii polialelice

Cercetări ulterioare experimentelor lui Mendel au arătat că deşi la nivelul unui singur individ există o singură pereche de loci omologi şi, ca atare, o singură pereche de gene alele, la nivelul unei populaţii de indivizi pot exista mai multe gene alele, ce constituie o ***serie polialelică***. Simplificat, genele dintr-o serie polialelică pot fi notate astfel: a_1, a_2, a_3, a_4, a_5, ..., a_n. Un individ conţine doar 2 gene din seria polialelică, de exemplu: a1/a3 sau a1/a5 sau a2/a2 sau a4/a4 etc. Astfel, unii indivizi sunt homozigoţi pentru o anumită genă (a1/a1; a2/a2 etc), iar alţii sunt heterozigoţi (a1/a2 sau a2/a3 etc).

Noţiunea de dominanţă/recesivitate a fost redefinită ca relaţia dintre 2 gene alele prezente în acelaşi individ. Astfel, este posibil ca gena a1 să fie dominantă faţă de gena a2 şi, ca urmare, heterozigotul a1/a2 să prezinte fenotip a1. Pe de altă

parte însă, este posibil ca aceeaşi genă a1 să fie recesivă faţă de a3 şi, deci, heterozigotul a1/a3 să aibă fenotip a3.

Cu alte cuvinte, în multe serii polialelice nici una dintre gene nu este dominantă faţă de toate celelalte.

1.2.7. Caractere poligenice

Cercetările au continuat şi au evidenţiat faptul că unele caractere sunt influenţate de mai multe gene ne-alele. Cu alte cuvinte, există caractere ce sunt determinate de combinaţii de gene de tipul [a2/a5; b3/b4], fiecare din cele două perechi de gene alele aparţinând la serii polialelice diferite: a1, ..., an şi b1, ..., bn. Fenomenul poartă numele de ***poligenie***, iar caracterul respectiv este determinat poligenic.

1.3. TEORIA CROMOZOMIALĂ A EREDITĂŢII

Geneticianul american Thomas Hunt Morgan şi echipa sa au elaborat între 1911 şi 1919 ***Teoria cromozomială a eredităţii***, teorie ce se bazează pe comportamentul cromozomilor în mitoză şi meioză. Pentru toate contribuţiile sale în domeniul geneticii, Morgan a primit în 1933 Premiul Nobel.

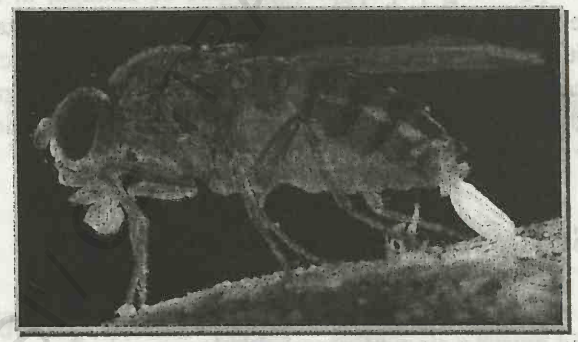


Figura 1.7 Musculiţă-de-oţet depunând un ou (după Encarta Encyclopedia, 2004).

Thomas Hunt Morgan

Biologul şi geneticianul american Thomas Hunt Morgan s-a născut în 1866 în Lexington, Kentucky, USA. Morgan a studiat embriologia la Universitatea Johns Hopkins unde şi-a luat şi doctoratul în 1891. Între 1904 şi 1928 a fost profesor de zoologie experimentală la Universitatea Columbia. La început a criticat teoriile lui Mendel, după care a realizat serii întregi de experimente şi analize citologice pe musculiţa-de-oţet. Astfel, Morgan şi studenţii săi A.H. Sturtevant, C. Blackman Bridges şi H.J. Muller au arătat faptul că cromozomii se comportă foarte asemănător cu "factorii ereditari" ai lui Mendel.

Morgan şi colaboratorii săi au publicat două lucrări importante - The Mechanism of Mendelian Heredity (Mecanismul Eredităţii Mendeliene, 1915) şi Theory of the Gene (Teoria Genei, 1926) – care au influenţat major etapele următoare în dezvoltarea geneticii moderne.
În 1933 Thomas Morgan a primit Premiul Nobel pentru fiziologie şi medicină.

1.3.1. Musculiţa-de-oţet

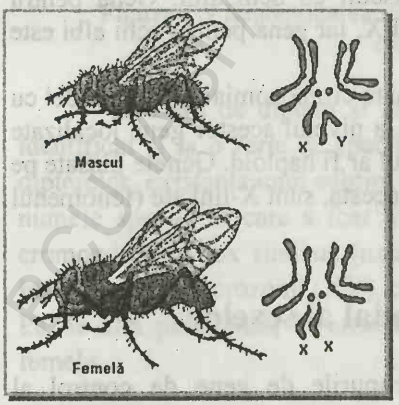
Musculiţa-de-oţet (Figura 1.7), cu denumirea ştiinţifică de *Drosophila melanogaster*, din punct de vedere ştiinţific face parte din Ordinul Diptera, Familia Drosophilidae. Este cunoscută oamenilor pentru că apare la oţet (de unde şi denumirea) sau la fructe fermentate. Adulţii au dimensiuni mici (3-4 mm), cu corp maron sau negru, cu ochi de obicei de culoare roşie.

Grupuri întregi de cercetători (dintre care cel mai cunoscut a fost grupul condus de Thomas Morgan) au ales musculiţa-de-oţet pentru cercetări citologice şi genetice din următoarele motive:

- se cresc foarte uşor şi ieftin, pe medii de cultură cu compoziţie simplă (apă, zahăr, agar-agar, drojdie-de-bere)
- au un ciclu de viaţă foarte scurt, de numai 10 – 12 zile la temperatura de 24°C; ca urmare, o nouă generaţie poate fi obţinută în aproximativ o sătămână; Drosophila este un dipter cu morfogeneză completă, adică traversează toate cele 3 stadii larvare:

adult → ou → larvă I → larvă II → larvă III → pupă → adult

- sunt foarte prolifice: un cuplu poate produce până la 500 de descendenţi
- această specie prezintă o variabilitate genetică foarte mare, chiar în populaţii naturale fiind prezente un număr mare de mutaţii
- are o garnitură cromozomială simplă, formată doar din 8 cromozomi, grupaţi în 4 perechi (Figura 1.8):



perechea I – sunt heterozomi, XX la femelă şi XY la mascul
perechea II – sunt autozomi, metacentrici
perechea III – sunt autozomi, submetacentrici
perechea IV – sunt autozomi, subtelocentrici

Figura 1.8 Cromozomii la musculţa-de-oţet.

1.3.2. Tezele teoriei cromozomiale a eredității

Prima teză a teoriei cromozomiale a eredității statuează faptul că genele sunt plasate linear în cromozomi, fiecare genă ocupând o anumită poziție denumită ***locus*** (cu pluralul *loci*).

A doua teză a teoriei cromozomiale statuează faptul că genele plasate pe același cromozom se transmit înlănțuit (împreună, în bloc) la descendenți. Morgan a denumit acest fenomen ***linkage*** și, deci, genele de pe același cromozom se transmit *linkat*. La baza fenomenului de linkage stă faptul că în timpul diviziunii celulare (fie mitoză, fie meioză) cromozomii se comportă ca entități de sine stătătoare; în transmiterea lor de la celula parentală la celulele fiice, cromzomii își păstrează individualitatea și integritatea structurală. Astfel, genele plasate pe același cromozom se transmit în bloc la celulele fiice, în contrast cu genele plasate pe cromozomi diferiți.

A treia teză a teoriei cromozomiale s-a bazat pe observația comportamentului cromozomilor în timpul meiozei. Astfel, în decursul profazei I a meiozei cromozomii omologi se apropie foarte mult unul de altul realizând așa-numita sinapsă cromozomială. Mai mult chiar, într-o asemenea structură (denumită **bivalent**), cromozomii omologi schimbă între ei fragmente cromatidice echivalente. Fenomenul a fost denumit ***crossing-over*** (mai este numit și **recombinare genetică intra-cromozomială**) și are efect invers față de linkage, producând netransmiterea înlănțuită a anumitor gene plasate pe același cromozom. Cercetări ulterioare au concluzionat că fenomenul de crossing-over reprezintă unul dintre cele mai importante mecanisme de variabilitate genetică la organisme eucariote, deci la organisme ce prezintă sexualitate.

Pe de altă parte, frecvența evenimentelor de crossing-over este direct proporțională cu lungimea cromozomului; cu alte cuvinte, probabilitatea ca 2 gene plasate pe același cromozom să nu se transmită înlănțuit crește cu distanța dintre ele.

Faptul că genele sunt plasate pe cromozom a fost arătat de Morgan încă din 1910 prin studii pe *Drosophila melanogaster*, care a constatat că în populațiile de tip sălbatic (cu ochi roșii) apăreau frecvent masculi cu ochi albi. Gena pentru culoarea ochilor (w+) este plasată pe cromozomul X, iar gena pentru ochi albi este recesivă (w).

La musculița de oțet, sexele sunt determinate cromozomial, pe un model cu femele XX și masculi XY. Ca urmare, o mutație la nivelul acestor gene localizate pe cromozomul X se exprimă ca și cum organismul ar fi haploid. Genele plasate pe cromozomul X și care, deci, se transmit o dată cu acesta, sunt X-linkate (fenomenul de ***X-linkage***).

1.3.3. Determinismul cromozomial al sexelor

La organismele eucariote dezvoltate grupurile de gene de control al dezvoltării sexuale se găsesc grupate pe anumiți cromozomi ce au fost denumiți

cromozomi de sex sau ***heterozomi***. În marea majoritate a cazurilor, aceşti cromozomi au fost notaţi cu literele **X** şi, respectiv, **Y**. Ceilalţi cromozomi din garnitură au fost denumiţi ***autozomi*** (notaţi cu litera **A**).

La *Drosophila*, dar şi la mamifere (inclusiv la om), femela reprezintă sexul homogametic având, pe lângă autozomi, doi heterozomi de acelaşi fel, notaţi XX. Garnitura cromozomială a unei femele poate fi scrisă astfel: 2A + XX. Denumirea de „sex homogametic" se datorează faptului că, prin meioză, femela formează gameţi ce pot conţine doar un singur tip de heterozomi, respectiv tipul X.

Masculul este sexul heterogametic şi conţine ca heterozomi câte un cromozom din fiecare tip. Garnitura sa este: 2A + XY. Din punct de vedere al heterozomilor, masculul formează două tipuri de gameţi: unii conţin cromozomul X, alţii Y. Datorită faptului că acest tip de determinism cromozomial al sexelor a fost descris prima oară la musculiţa-de-oţet, a fost denumit ***determinism tip Drosophila*** (Figura 1.9).

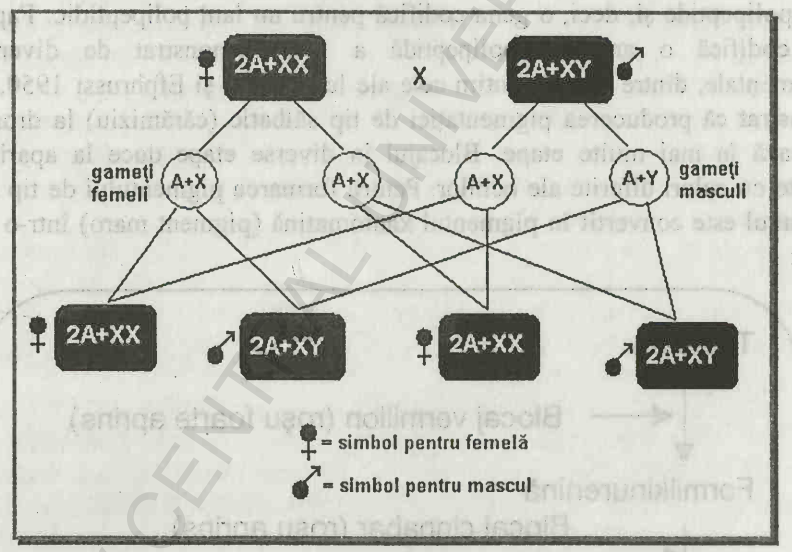


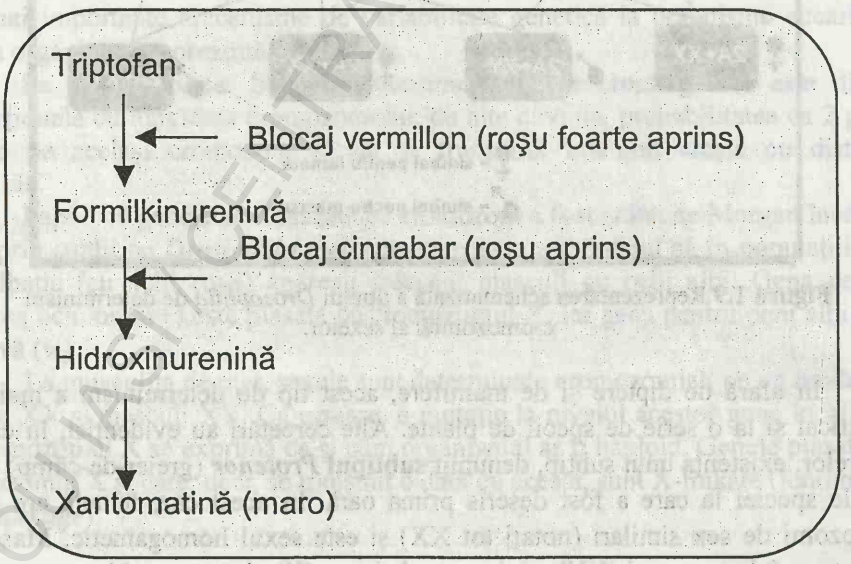
Figura 1.9 Reprezentarea schematizată a tipului *Drosophila* de determinism cromozomial al sexelor.

În afară de diptere şi de mamifere, acest tip de determinism a mai fost identificat şi la o serie de specii de plante. Alte cercetări au evidenţiat, în cadrul dipterelor, existenţa unui subtip, denumit **subtipul *Protenor*** (greier-de-câmp) de la numele speciei la care a fost descris prima oară. În acest caz, femela are tot 2 cromozomi de sex similari (notaţi tot XX) şi este sexul homogametic. Masculul însă nu are 2 heterozomi (XY), ci doar unul singur (X) şi este sexul heterogametic. Pe de altă parte însă, în ansambu, masculul are un cromozom mai puţin decât femela.

Există şi specii la care masculul este sexul homogametic (2A + XX), iar femela este sexul heterogametic (2A + XY - tipul *Abraxas* sau pasăre sau 2A + X0 - subtipul fluture).

1.4. DEFINIREA GENEI

Gena este unitatea fundamentală a eredităţii reprezentând un segment de ADN. Funcţia genelor a fost stabilită după 1945, când a fost iniţiată ipoteza că o genă codifică pentru o anumită enzimă, fiecare etapă catabolică fiind catalizată de o anumită enzimă codificată de o anumită genă. În consecinţă, o mutaţie la nivelul unei gene blochează activitatea enzimei şi, implicit, calea metabolică corespunzătoare. Ulterior s-a stabilit că, de fapt, o proteină poate fi formată din mai multe polipeptide şi, deci, o gena codifică pentru un lanţ polipeptidic. Faptul că o genă codifică o anumită polipeptidă a fost demonstrat de diverse date experimentale, dintre care amintim cele ale lui Beadle şi Efphrussi 1950, care au demonstrat că producerea pigmentaţiei de tip sălbatic (cărămiziu) la drosofile se realizează în mai multe etape. Blocajul în diverse etape duce la apariţia unor mutante cu culori diferite ale ochilor. Pentru formarea pigmentului de tip sălbatic, triptofanul este convertit în pigmentul xantomatină (pigment maro) într-o serie de reacţii:



Concepţia clasică despre genă consideră că gena este indivizibilă şi că determină un anumit fenotip, fiind cea mai mică unitate de mutaţie şi recombinare. În concepţia modernă, gena este divizibilă, cea mai mică unitate de mutaţie şi

recombinare fiind perechea de nucleotide, denumită muton şi, respectiv, recon. Pentru stabilirea structurii fine a genei s-au realizat iniţial experimente pe bacteriofagul T4 de către Seymour Benzer (1955-1962). Bentzer a adaptat la fagul T4 testul de complementaţie, utilizat anterior la organismele superioare.

Complementaţia genetică reprezintă interacţiunea dintre 2 seturi de gene care permite celulei sau virusului să manifeste o anumită funcţie deşi fiecare set de gene poartă o mutaţie la nivelul unei gene esenţiale. Testul de complementaţie (testul cis-trans, test de alelism) stabileşte dacă 2 mutaţii aparţin la 2 gene diferite sau sunt intragenice.

Gena în testul cis-trans poartă numele de cistron, acesta fiind o unitate de funcţie, o regiune cromozomală ce codifică un produs celular specific şi este format dintr-o multitudine de locusuri potenţial mutabile, între care se poate realiza recombinare genetică.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. STRUCTURA ACIZILOR NUCLEICI

2.1. INTRODUCERE

Trăsăturile (caracterele) ereditare se caracterizează prin capacitatea de a se transmite de la o generaţie la cealaltă. Caracterele ereditare sunt determinate de "factorii" genetici, iar totalitatea acestora alcătuiesc ***genotipul*** unui organism. În timpul vieţii oricărui organism genotipul acestuia funcţionează (adică se exprimă), iar din interacţiunea genotipului cu mediul rezultă manifestarea "vizibilă", denumită ***fenotip***. Toate funcţiile unui organism, fie el unicelular, fie pluricelular, sunt îndeplinite cu ajutorul materialului genetic.

Genetica este ştiinţa care studiază caracterele ereditare ale organismelor, structura şi funcţionarea acestora, modul în care se transmit la descendenţi. Datorită dezvoltării tehnicilor de studiu în ultimii douăzeci de ani, în prezent genetica este reprezentată de un complex întreg de ştiinţe, de la citogenetică clasică, până la inginerie genetică.

Setul complet de informaţie genetică dintr-un organism poartă numele de ***genom***. Cercetările desfăşurate pe întindere de aproape un secol au demonstrat că toate organismele descrise pe Terra până în prezent au genom format din acizi nucleici. Mai mult decât atât, la toate organismele, atât cele procariote, cât şi cele eucariote, au genomul format din ADN. Se poate deci spune că molecula ADN reprezintă materialul genetic aproape universal pe Pământ. O excepţie notabilă o reprezintă anumite virusuri, la care materialul genetic este reprezentat de molecule ARN.

Viaţa - flux continuu de informaţie

Dintr-un anumit punct de vedere, viaţa ar putea fi definită şi ca un flux continuu de informaţie. Astfel, materialul genetic conţine informaţie pentru:

- formarea tuturor structurilor unei celule
- pentru diferenţierea unor diverse tipuri de celule şi ţesuturi
- pentru desfăşurarea tuturor reacţiilor biochimice şi, în final, fiziologice
- multiplicarea celulelor şi pentru înmulţirea organismelor
- pentru moartea celulară şi chiar şi pentru moartea unui organism întreg

2.2. STRUCTURA PRIMARĂ A ACIZILOR NUCLEICI

Acizii nucleici reprezintă molecule foarte complexe, produse atât de organisme vii (celule), cât şi de virusuri. Denumirea de „acizi nucleici" se datorează faptului că prima oară au fost izolate din nuclei de celule. Cercetări ulterioare au dovedit însă faptul că anumite tipuri de acizi nucleici nu se găsesc în nucleu, ci în citoplasmă.

În ansamblu, acizii nucleici îndeplinesc două funcţii biologice majore:

- transmit informaţia ereditară de la o generaţie la alta
- conţin informaţie pentru producerea de proteine specifice

Există două categorii majore de acizi nucleici : acid deoxiribonucleic (pe scurt, ADN) şi acid ribonucleic (pe scurt, ARN).

O molecula de acid nucleic este formată din unităţi de bază, numite **nucleotide**, legate între ele prin legături chimice de tip covalent (legături fosfodiesterice).

Fiecare nucleotidă este alcătuită din 3 categorii de molecule, şi ele legate între ele (Figurile 2.1 şi 2.2):

- bază azotată
- pentoză (un zahar format din 5 atomi de carbon)
- un rest de radical fosforic

Atât în structura ADN, cât şi în ARN, există 4 tipuri majore de baze azotate:

adenină, timină, citozină, guanină - în ADN
adenină, uracil, citozină, guanină - în ARN

Adenina şi guanina sunt baze azotate derivate din structura purinei şi, ca atare, mai sunt numite şi baze purinice (sau, simplu purine). Timina, citozina şi uracilul sunt derivate din structura pirimidinei – baze pirimidinice/pirimidine (Figura 2.3). În mod curent, cele 5 baze azotate se prescurtează A, T, C, G şi, respectiv, U.

Pentoza este, fie riboză – în ARN, fie deoxiriboză – în ADN (Figura 2.4)

Formarea nucleotidelor
Bază azotată + pentoză = nucleosid
de ex. A + pentoză = adenosina
nucleosid + radical fosforic = nucleotid
de ex. adenosină + radical fosforic = acid adenilic

Figura 2.1 Clasificarea nucleosidelor şi a nucleotidelor.

Denumirea nucleosidelor şi a nucleotidelor

		Baze azotate			
		Purine		Pirimidine	
		Adenină (A)	Guanină (G)	Citozină (C)	Uracil (U) Timină (U)
Nucleoside	în ARN	adenosina	guanosină	citidină	uridină
	în ADN	Deoxiadenosină	deoxiguanosină	deoxicitidina	Deoxitimidină
Nucleosid mono-, di-, trifosfaţi (în ARN)		AMP, ADP, ATP	GMP, GDP, GTP	CMP, CDP, CTP	UMP, UDP, UTP
Deoxinucleosid mono-, di-, trifosfaţi (în ADN)		dAMP dADP dATP	dGMP dGDP dGTP	dCMP dCDP dCTP	dTMP dTDP dTTP
Nucleotide	în ARN	acid adenilic	acid guanosilic	acid citidilic	acid uridilic
	în ADN	acid deoxiadenilic	acid deoxiguanosilic	acid deoxicitidilic	acid deoxitimidilic

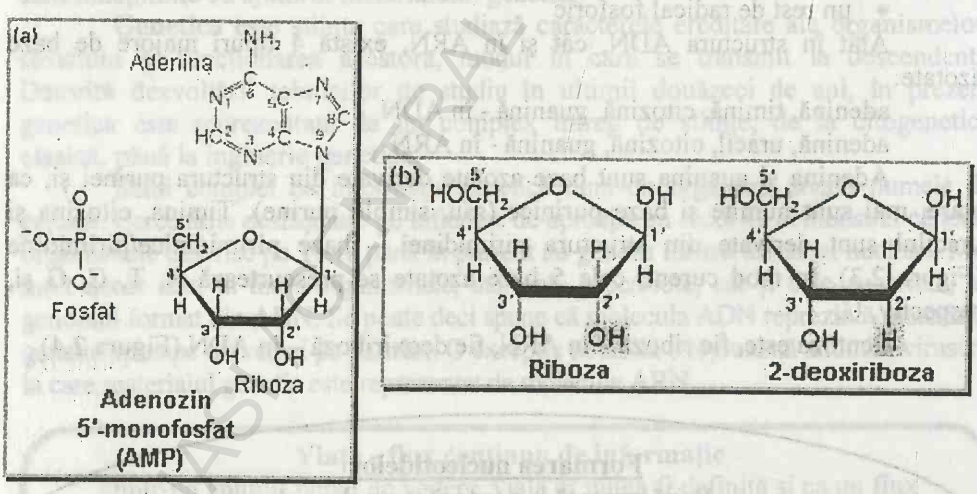


Figura 2.2 Toate nucleotidele au acelaşi plan general de structură.
(a) Structura chimică a riboadenozin 5'-monofosfatului (AMP), nucleotid prezent în moleculele ARN. (b) Structura chimică a celor 2 zaharuri prezente în moleculele de acizi nucleici: riboza în ARN şi 2-deoxiriboza în ADN.

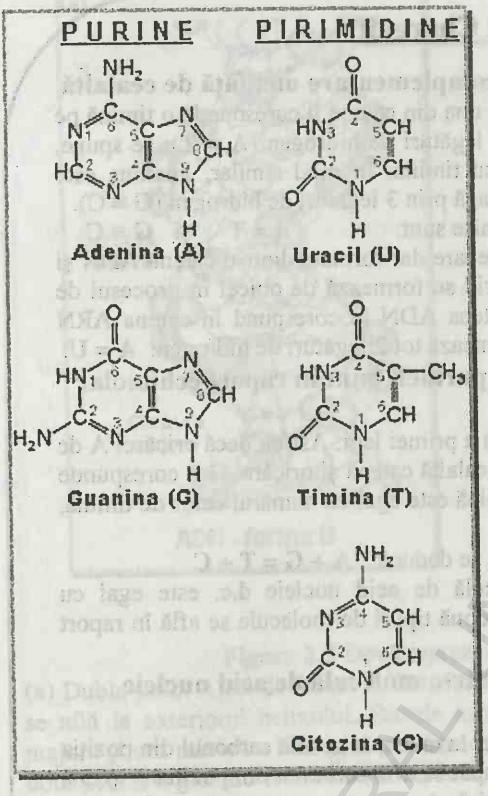


Figura 2.3 Structura chimică a principalelor baze azotate din acizii nucleici. Azotul din poziția 9 (N9) al purinelor și azotul 1 (N1) al pirimidinelor se leagă la carbonul din poziția 1' (C1') al unei molecule de riboză sau deoxiriboză.

2.3. STRUCTURA SECUNDARĂ A ACIZILOR NUCLEICI

Nucleotidele se leagă între ele prin legături fosfodiesterice ce se formează între o pentoză a unui nucleotid și radicalul fosforic al nucleotidului următor. Asemenea lanțuri de nucleotide poartă numele de **catene polinucleotidice** și reprezintă structura primară a unui acid nucleic. Astfel de molecule sunt, deci, ***monocatenare*** (prescurtat **m.c.**)

Mai toate tipurile de acizi ribonucleici (ARN) sunt formate dintr-o singură catenă polinucleotidică, în timp ce majoritateta moleculelor de ADN sunt alcătuite din două catene polinucleotidice, având astfel și o structură secundară. Asemenea molecule sunt ***dublucatenare*** (prescurtat **d.c.**).

Formarea unor molecule de acizi nucleici dublucatenare respectă o serie de legi chimice, ce poartă numele cercetătorului care le-a descris prima oară – Chargaff (vezi caseta cu Legile lui Chargaff).

Legile lui Chargaff

1. cele 2 catene polinucleotidice sunt complementare una față de cealaltă

Aceasta înseamnă că unei adenine de pe una din catene îi corespunde o timină pe cealaltă catenă, de care se leagă prin 2 legături de hidrogen (A = T); se spune, deci, că adenina este complementară cu timina. În mod similar, guanina este complementară cu citozina, de care se leagă prin 3 legături de hidrogen (G ≡ C).

Se deduce că legăturile de hidrogen permise sunt: **A = T** și **G ≡ C**

În moleculele de acizi nucleici dublucatenare dar formate dintr-o catenă ADN și o catenă ARN (asemenea molecule hibrid se formează de obicei în procesul de transcriere genetică), adeninelor din catena ADN le corespund în catena ARN molecule de uracil. Și în acest caz se fromează tot 2 legături de hidrogen: **A = U.**

2. într-o moleculă de acid nucleic d.c. purinele sunt în raport echimolar cu pirimidinele

Această regulă este, de fapt, o consecință a primei legi. Astfel, dacă oricărei A de pe una din catene îi corespunde o T pe cealaltă catenă și oricărei G îi corespunde o C, atunci numărul moleculelor de adenină este egal cu numărul celor de timină, adică A = T și, respectiv, G = C

De aici, prin adunarea celor două ecuații, se deduce: **A + G = T + C**

Deci, numărul purinelor dintr-o moleculă de acid nucleic d.c. este egal cu numărul pirimidinelor. Altfel spus, cele două tipuri de molecule se află în raport echimolar.

3. cele două catene polinucleotidice dintr-o moleculă de acid nucleic d.c. sunt antiparalele

O catenă polinucleotidică are două capete: la un capăt se află carbonul din poziția 5' (C5') al unei pentoze, iar la celălalt capăt se află carbonul din poziția 3' (C3') al unei alte pentoze. În interiorul unei celule o asemenea catenă polinucleotidică este sintetizată chiar în această direcție: **5' → 3'.**

Cele 2 catene polinucleotidice ale unei molecule d.c. sunt în orientări inverse una față de cealaltă: capul 5' al fiecăreia corespunde cu capul 3' al celeilalte. Cele 2 catene sunt antiparalele.

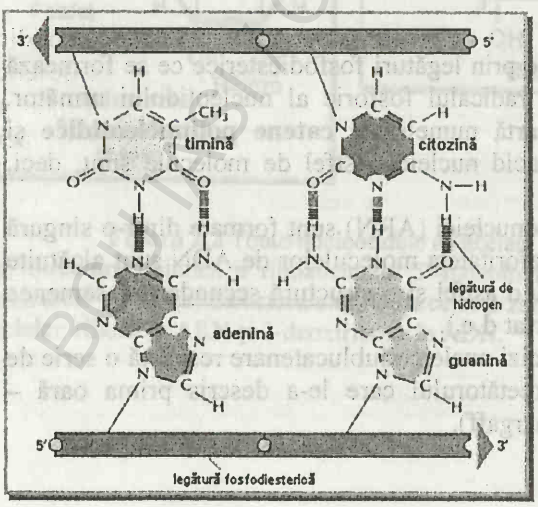


Figura 2.4 Reprezentare schematică a unei porțiuni dintr-o moleculă de ADN d.c.

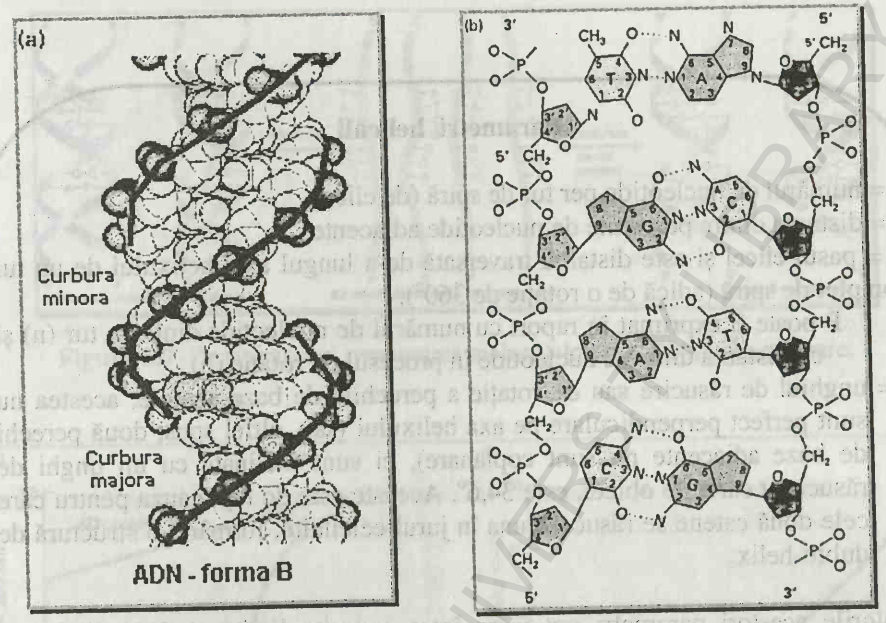


Figura 2.5 Două reprezentări ale dublului helix ADN.
(a) Dublu-helix ADN de formă B. Scheletul glucido-fosforic (în *gri* şi marcat cu linii ***roşii***) se află la exteriorul helixului. Bazele azotate se află la interior. Sunt marcate curbura majoră şi cea minoră a helixului. **(b)** Structura schematizată a unui ADN dublu-helix. Cele două schelete glucido-fosforice (în verde închis şi deschis) sunt în orientare inversă: 5' – 3', faţă de 3' - 5'. Bazele azotate de pe cele două catene sunt prezentate în ***albastru*** şi ***roşu***.

2.4. ADN – „ELICEA VIEŢII"

Datorită formei spaţiale a nucleotidelor cele 2 catene polinucleotidice dintr-o moleculă d.c. se dispun spaţial una faţă de cealaltă într-o formă de elice (dublu helix), învârtindu-se una în jurul celeilalte şi amândouă în jurul unui ax central. Această dispunere formează **structura terţiară** a unei molecule de acid nucleic d.c. În arhitectura unei asemenea molecule, la exterior se găsesc cele 2 schelete glucido-fosforice ale catenelor, iar spre interior sunt bazele azotate.

Perioada modernă a biologiei moleculare a început în 1953, când James Watson, Francis Crick şi Maurice Wilkins au propus modelul de structură dublu-helicală a ADN. Toate cercetările ulterioare au demonstrat corectitudinea acestui model (Figurile 2.4 şi 2.5).

Un dublu-helix de acid nucleic prezintă o serie de parametri fizici, denumiţi parametri helicali (vezi caseta cu parametri helicali).

Parametri helicali

n = numărul de nucleotide per tur de spiră (de elice)
h = distanța dintre perechile de nucleotide adiacente
P = pasul elicei și este distanța traversată de-a lungul axei helixului de un tur complet de spiră (adică de o rotație de 360°).

P poate fi exprimat în raport cu numărul de nucleotide dintr-un tur (n) și cu distanța dintre 2 nucleotide în procesul de rotație (h)

t = unghiul de răsucire sau de rotație a perechile de baze azotate; acestea nu sunt perfect perpendiculare pe axa helixului (sau, altfel spus, două perechi de baze adiacente nu sunt coplanare), ci sunt înclinate cu un unghi de răsucire t care, de obicei, este 34,6°. Aceaste este de fapt cauza pentru care cele două catene se răsucesc una în jurul celeilalte, formând o structură de dublu-helix.

Valorile acestori parametri pot varia între anumite limite și determină mai multe forme topologice ale moleculei de ADN d.c.

Forma B reprezintă conformația cel mai des întâlnită în celule. Are un diametru de aproximativ 20 Angstrom (Å), iar distanțele dintre perechile de baze este de aproximativ 3,4 Å. În această conformație există o medie de 10,4 baze azotate per tur de spiră, iar unghiul de rotație dintre 2 baze adiacente este de +34,6°.

Forma A se întâlnește în celule în regiunile dublucatenare ale moleculelor de ARN și în dublu-helixurile hibride ADN – ARN ce se formează în procesele de transcriere genetică. Are un diametru de aproximativ 23 A, 11 baze per tur de spiră și un unghi de +34,7°.

Forma Z este mai subțire (un diametru de 18A), 12 baze per tur și un unghi de -30° între ele. Datorită acestui lucru, formele A și B sunt denumite "de dreapta", iar forma Z este "de stânga".

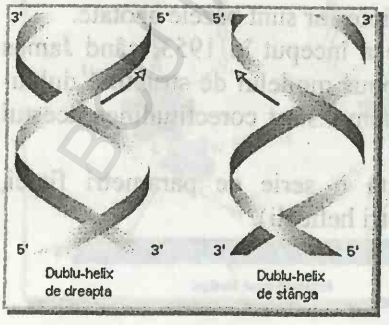


Figura 2.6 Reprezentarea schematică a celor 2 forme principale de ADN d.c.

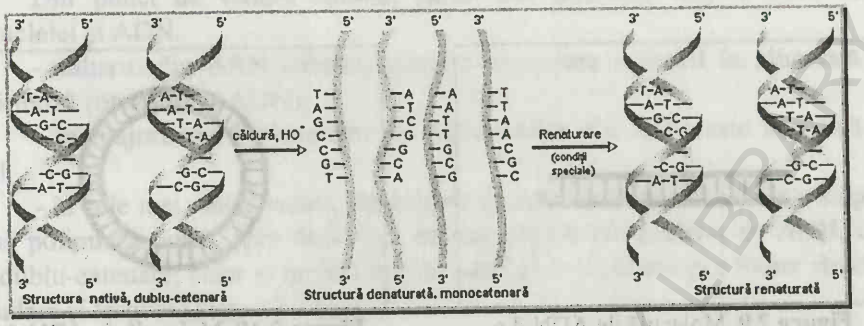


Figura 2.7 Denaturarea şi renaturarea moleculelor de ADN dublu-catenare.

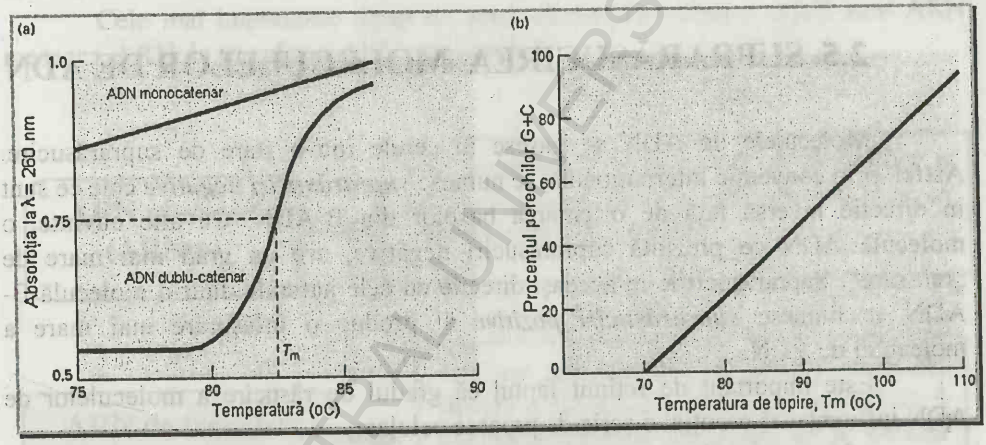


Figura 2.8 Variaţia absorbanţei în denaturarea termică a ADN. (a) Denaturarea ("topirea") moleculelor de ADN d.c. poate fi monitorizată prin variaţia absorbanţei în lumină ultravioletă 260 nm: pe măsură ce ADN denaturează, absorbanţa creşte până aproape de dublu. Temperatura la care jumătate din molecule sunt denaturate poartă numele de temperatură de topire (Tm). (b) Valoarea Tm depinde de conţinutul în guanină şi citozină a moleculelor de ADN d.c.: cu cât procentul molar de guanină – citozină (%molGC) este mai mare, cu atât este mai mare şi valoarea Tm.

Moleculele de ADN d.c. pot fi lineare sau circulare (Figurile 2.9 şi 2.10).

Astfel, cromozomii la organismele eucariote, dar şi o serie de plasmide, sunt alcătuite din molecule de ADN d.c. linear.

Cromozomul bacterian, precum şi o serie de plasmide bacteriene, sunt alcătuite din molecule de ADN d.c. circular.

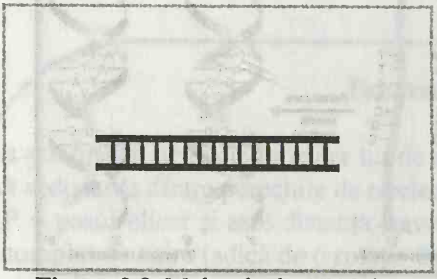


Figura 2.9 Moleculă de ADN d.c. linear.

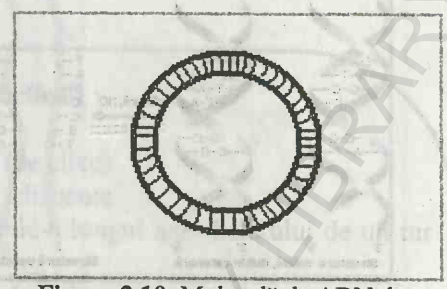


Figura 2.10 Moleculă de ADN d.c. circulară.

2.5. SUPRARĂSUCIREA MOLECULELOR DE ADN

Moleculele de ADN se găsesc în celule într-o stare de suprarăsucire. Astfel, prin convenţie internaţională, se numesc ***suprarăsuciri negative*** cele ce sunt in direcţie inversă faţă de orientarea bazelor din B-ADN. Cu alte cuvinte, o moleculă ADN ce prezintă suprarăsuciri negative, are un grad mai mare de „relaxare". Suprarăsucirile in aceeaşi direcţie cu cele naturale dintr-o moleculă B-ADN se numesc ***suprarăsuciri pozitive*** şi produc o înfăşurare mai mare a moleculei de ADN.

Este important de reţinut faptul că gradul de răsucire a moleculelor de ADN influenţează esenţial o serie de procese celulare:

- în comparaţie cu cromozomii eucariotelor, cromozomul bacterian este mult mai mic; cu toate acestea, această moleculă de ADN ce reprezintă cromozomul bacterian nu ar încăpea în celula bacteriană dacă nu ar fi suprarăsucit şi împachetat

- diverse procese, ca replicare, transcriere, recombinare precum şi repararea moleculelor de ADN, presupun derăsucirea locală a moleculelor de ADN.

2.6. ACIZII RIBONUCLEICI

Pe de o parte, acizii ribonucleici reprezintă materialul genetic al anumitor tipuri de virusuri (numite virusuri ARN). Pe de altă parte, în celule, moleculele de ARN îndeplinesc diverse funcţii metabolice, dintre care cele mai importante sunt legate de traducerea informaţiei genetice din secvenţă de nucleotide în secvenţă de aminoacizi, adică în sinteza de proteine.

Din punct de vedere chimic, există trei diferențe majore între acizii ribonucleici și ADN:

- zaharul din ARN (riboza) conține o grupare hidroxil în plus față de deoxiriboză (prezentă în ADN);
- în majoritatea moleculelor de ARN timina din ADN este înlocuită cu uracil;
- în cele mai multe cazuri, moleculele de ARN sunt formate dintr-o singură catenă polinucleotidică, spre deosebire de majoritatea moleculelor de ADN, care sunt dublu-catenare; chiar și moleculele de ARN monocatenare pot forma structuri secundare și terțiare (Figura 2.11);
- unele molecule de ARN (în mod special, ARNt) mai conțin și o serie de baze azotate modificate, de exemplu pseudouridina, dihidrouridina, riboziltimina, inozina.

Cele mai importante tipuri de acizi ribonucleici dintr-o celulă sunt ARN mesager, ARN de transfer și ARN ribozomal.

ARN mesager (ARNm)	este o moleculă intermediar ce reprezintă o copie a uneia din cele 2 catene ale unei gene ce codifica pentru o proteină
ARN de transfer (ARNt)	este un intermediar în sinteza proteică; fiecare moleculă de ARNt are o zonă de 3 nucleotide numită anticodon, iar pe de altă parte, la unul din capete se leagă de un anumit aminoacid
ARN ribozomal (ARNr)	este un component major al ribozomilor, intervenind tot în sinteza de proteine

Toate moleculele de ARN dintr-o celulă iau naștere printr-un proces numit **transcriere genetică.**

Molecula rezultată poartă numele de **transcript primar** și este ulterior procesată, în funcție de gena care a fost transcrisă, pentru a deveni ARNm, ARNt sau ARNr.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Moleculele de ARN au un rol central în exprimarea genelor. Inițial, aceste molecule au fost descrise ca intermediar în sinteza proteică; ulterior însă, s-a constatat că există multe clase de ARN ce îndeplinesc roluri complexe în diverse etape ale exprimării genelor. Implicarea moleculelor de ARN în foarte multe funcții celulare și, în mod special în expresia genică, reprezintă unul din argumentele majore în sprijinul teoriei conform căreia, în fazele inițiale ale apariției și evoluției sistemelor biologice, ARN ar fi reprezentat componenta activă în menținerea și expresia informației genetice, și nu moleculele de ADN, care probabil au apărut mult mai târziu; se vorbește deci, de o așa-zisă *„lume ARN"*.

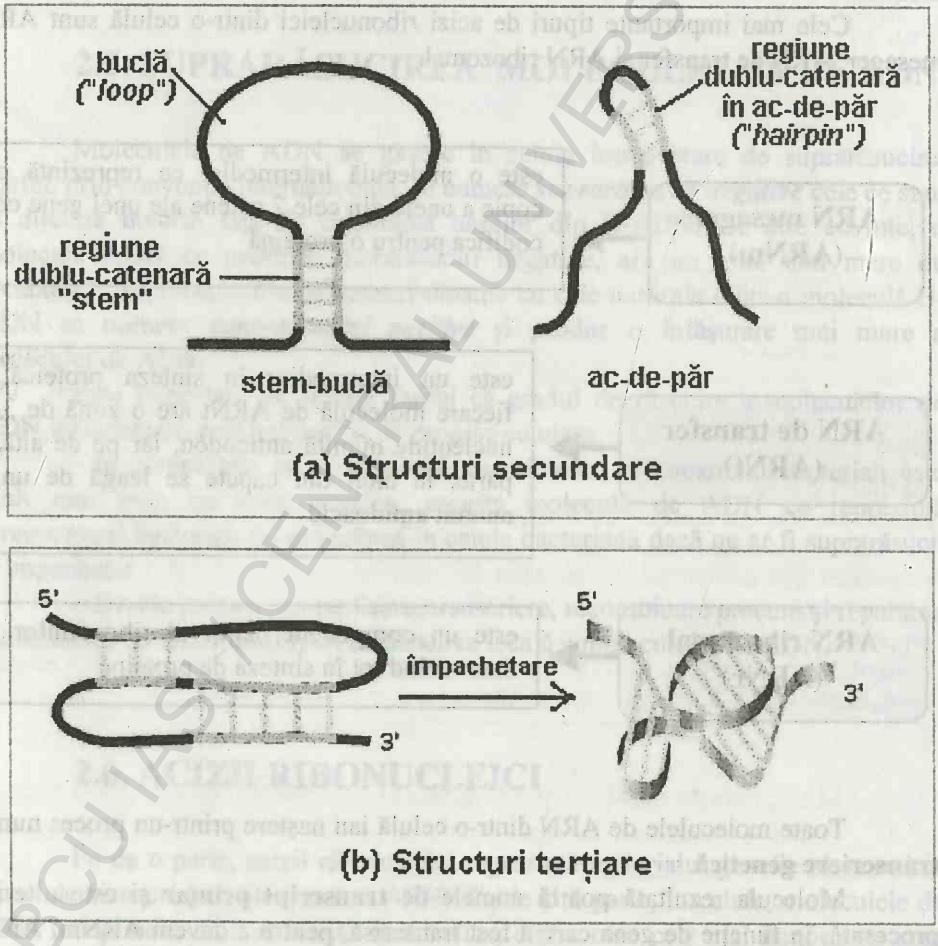


Figura 2.11 Structuri secundare (a) și terțiare (b) în moleculele de ARN; aceste structuri se formează pe baza existenței unor zone cu complementaritate intracatenară. (dupa Lodish, 2000)

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITARĂ

3. CROMOZOMUL LA ORGANISME PRO- ŞI EUCARIOTE

3.1 CROMOZOMUL BACTERIAN

3.1.1. Dimensiune

Imensa majoritate a bacteriilor deţin ca material genetic esenţial o moleculă ADN dublu catenar circular covalent închis, suprarăsucit negativ şi împachetat. Deşi complexarea cu proteine şi împachetarea nu este identică cu cea din cromozomii de tip eucariot, totuşi această moleculă este denumită tot "*cromozom*" sau *nucleoid*. Cromozomul bacterian este ataşat la membrana plasmatică a celulei bacteriene în aproximativ 20 de puncte, dar o funcţie deosebită o are punctul de ataşare de lângă regiunea de origine a replicării acestei molecule de ADN (*ori C*).

Cei mai mici cromozomi de tip procariot măsoară mai puţin de 1 Mpb şi se întâlnesc mai ales la bacteriile fără perete celular (bacteriile din genurile *Mycoplasma*, *Ureaplasma* au cromosomi cu dimensiuni cuprinse între 600 şi 800 kpb). La cealaltă extremă se află bacteriile din genurile *Myxococcus* şi *Calothrix*, care au cromozomi foarte mari (aproximativ 12-13000 kpb). *Escherichia coli* are un cromozom de dimensiune intermediară: 4700 kpb.

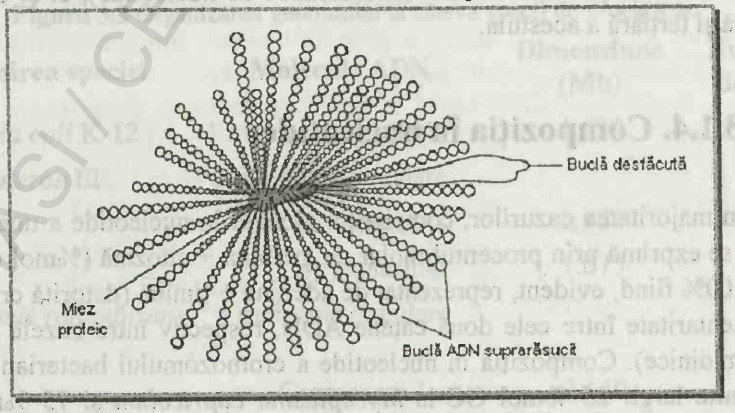


Figura 3.1 Modelul Pettijohn de structură a nucleoidului din bacteria *Escherichia coli*. Între 40 şi 50 de bucle suprarăsucite radiază dintr-un miez proteic (după Brown, 2002).

3.1.2. Modelul Pettijohn

În general, molecula ADN ce formează cromozomul bacterian este de aproximativ 1000 de ori mai lungă decât celula bacteriană. Această moleculă este complexată cu proteine, suprarasucită şi împachetată formând o structură conformă cu modelul elaborat de **Pettijohn** în 1974 (Figura 3.1). Conform acestui model, prin asocierea ADN cu proteine şi cu ARN (de regulă, ARN nascent) se formează aproximativ 50 de domenii topologice, semi-independente (denumite şi bucle), per genom de *E.coli*. Fiecare domeniu (buclă) este suprarăsucit separat de celelalte domenii şi poate fi relaxat independent de celelalte prin introducerea unei rupturi monocatenare. Gradul de suprarăsucire negativă este dat de balanţa dintre activitatea a doua enzime - ADN giraza şi ADN topoizomeraza I – amândouă reglând densitatea helicală a moleculelor de ADN. ADN giraza creşte numărul de spire per kilopereche de baze azotate (suprarăsuceşte molecula de ADN), iar ADN topoizomeraza I scade numărul de spire.

3.1.3. Configuraţii ADN în cromozomul bacterian

Principalul tip de structură secundară a ADN ce formează cromozomul bacterian este **forma B de dreapta**, dar această configuraţie nu se găseşte uniform de-a lungul întregului cromosom bacterian. Alte configuraţii, prezente pe distanţe scurte, sunt ADN-Z (în dublu helix de stânga), structuri cruciforme (în regiunile cu secvenţe invers repetate) şi regiuni triplu-catenare (în zone extrem de bogate în purine sau pirimidine).

Este de reamintit faptul că, în general, expresia genică este afectată nu numai de secvenţa primară a ADN (succesiunea de nucleotide), ci şi de structura secundară şi terţiară a acestuia.

3.1.4. Compoziţia în nucleotide

În majoritatea cazurilor, compoziţia globală în nucleotide a unei molecule de ADN se exprimă prin procentul molar de guanină + citozină (%mol GC), restul până la 100% fiind, evident, reprezentat de adenină + timină (datorită criteriului de complementaritate între cele două catene ADN, respectiv între bazele purinice şi cele pirimidinice). Compoziţia în nucleotide a cromozomului bacterian variază în limite foarte largi: 25 %mol GC la *Mycoplasma capricolum* şi 75 %mol GC la *Micrococcus luteus*.

Procentul molar de guanină – citozină în cromozomul bacterian

Procentul molar de guanină + citozină este corelat şi cu compoziţia în codoni a genomului. Aceasta variază în sensul preferinţei pentru 1-2 codoni dintr-un grup de codoni sinonimi. Se constată astfel că la *Mycoplasma capricolum* este favorizată prezenta A/T în poziţia 3-a a codonilor sinonimi.

S-a mai constatat că în cromosomul bacterian există şi o serie de gene a căror activitate poate afecta compoziţia totală în nucleotide a unei molecule de ADN. Astfel, la *E.coli* au fost descrise două gene (***mut T*** şi ***mut Y***) care afectează frecvenţa transversiilor A-T / C-G şi, respectiv, C-G / A-T. Echilibrul între exprimarea acestor două gene afectează compoziţia globală în nucleotide a moleculei de ADN ce reprezintă cromosomul de *E.coli*.

O altă problemă o reprezintă contextul de citire a unui anumit codon, în speţă, configuraţia codonilor adiacenţi. Numărul teoretic posibil de codoni (sens) adiacenţi este foarte mare (612 = 3721), dar, examinând 237 de gene de la *E.coli* s-a constatat că perechile de codoni adiacenţi nu sunt distribuite randomizat, ci anumite perechi de codoni sunt mai abundente decât altele. S-a dedus astfel că, compoziţia în nucleotide a unui codon este corelată şi cu compoziţia codonilor adiacenţi, corelat probabil cu procesele de ataşare la situsurile A (*Aminoacil*) şi P (*Peptidil*) ale ribozomilor. Se pare deci, că aparatul de traducere a informaţiei genetice ar fi putut să determine evoluţia unor anumite trăsături ale matriţei genetice.

Figura 3.2 Organizarea genomului la câteva specii de procariote.

Denumirea speciei	Molecule ADN	Dimensiune (Mb)	Numărul de gene
Escherichia coli K-12	1 moleculă circulară	4.639	4397
Vibrio cholerae El	2 molecule circulare		
	1 cromozom	2.961	2770
	1 megaplasmid	1.073	1115
Deinococcus radiodurans R1	4 molecule circulare		
	Cromozom 1	2.649	2633
	Cromozom 2	0.412	369
	Megaplasmid	0.177	145

	Plasmid	0.046	40
Borrelia burgdorferi B31	7 – 8 molecule circulare 11 molecule lineare		
	Cromozom linear	0.911	853
	Plasmid circular cp9	0.009	12
	Plasmid circular cp26	0.026	29
	Plasmid circular cp32	0.032	necunoscut
	Plasmid linear lp17	0.017	25
	Plasmid linear lp25	0.024	32
	Plasmid linear lp28-1	0.027	32
	Plasmid linear lp28-2	0.030	34
	Plasmid linear lp28-3	0.029	41
	Plasmid linear lp28-4	0.027	43
	Plasmid linear lp36	0.037	54
	Plasmid linear lp38	0.039	52
	Plasmid linear lp54	0.054	76
	Plasmid linear lp56	0.056	necunoscut

3.1.5. Proteine asociate cu cromozomul bacterian

În afară de ARN polimeraza, care datorită ratei înalte de transcriere la procariote, rămâne asociată cvasi-permanent cu moleculele de ADN, cromozomul bacterian este asociat cu o serie de proteine bazice, similare cu histonele de la organismele eucariote, denumite ***proteine histone-like***.

La *E.coli* au fost descrise 9 specii moleculare de proteine bazice, cu greutate moleculare între 9 şi 28 kd, care se ataşează la ADN într-o manieră situs-nespecifică şi care au funcţii similare cu histonele de la organismele eucariote. Dintre cele 9 specii moleculare proteice, cea mai importantă este o proteină denumită **HU** (« Helix–Unwinding » = desfacerea dubului helix). Din complexarea moleculelor HU cu ADN cromozomal bacterian se formează structuri similare cu nucleosomii de la eucariote, denumite ***structuri nucleosom-like*** (chiar şi în condiţii *în vitro*), în care sunt cuprinse circa 200 pb/nucleosom. Structurile *nucleosom-like* nu sunt statice, ci se află într-un echilibru dinamic.

Studii mai ample au demonstrat faptul că proteina HU nu este o simplă proteină structurală a arhitecturii cromozomului bacterian, ci are rol foarte important în diverse procese din celula bacteriană – în mod special în procese ce implică

interacţiuni ADN-proteine, situaţie în care moleculele HU favorizează ataşarea altor proteine la ADN.

Deşi proteinele *histone-like* au fost studiate extensiv la *E.coli*, totuşi au fost identificate proteine cu funcţii omoloage şi la alte genuri şi specii bacteriene. Pe de altă parte, s-a constatat că o serie de microorganisme din grupul ***Archaea*** prezintă proteine *histone-like* cu structură intermediară între cele de la ***Bacteria*** şi histonele de la ***Eukarya***.

Proteina HU

→ este cea mai importantă proteină *histone-like* de la *E.coli*
→ au fost descrise proteine tip HU la toate bacteriile studiate
→ ca şi histonele de la organismele eucariote, proteina HU se ataşează la molecule de ADN d.c. indiferent de secvenţa de nucleotide, deci situs - nespecific
→ are un caracter bazic şi o greutate moleculară de 9,7 kd
→ funcţionează ca dimer
→ un monomer este format din 2 polipeptide, denumite **HU-α** şi **HU-β** şi codificate de gene diferite: ***hup A*** şi, respectiv, ***hup B***.
→ are proprietăţi fizice şi compoziţie totală în aminoacizi similară cu histonele de la eucariote, dar secvenţa de aminoacizi este diferită de acestea.
→ ca şi histonele de la eucariote, proteina HU are un grad înalt de conservare în lumea bacteriană
→ există aproximativ 25000 de molecule HU per genom de *E.coli*, dar aceste molecule nu sunt dispuse uniform de-a lungul cromozomului bacterian, ci sunt mai dense la periferia nucleoidului (în zonele extrem de active transcripţional)

Proteina IHF

Alte proteine *histone-like* de la *E.coli* sunt proteina H (similară cu histona H2A de la eucariote), proteina H1, proteina H-NS, proteina IHF.

Proteina IHF (*Integration Host Factor*, g.m.=20 kd)

- ✓ a fost descoperită în studiile privind integrarea genomului fagului în cromozomul de *E. coli* ; ulterior, s-a constatat că această proteină intervine şi într-o serie de alte procese din celula bacteriană
- ✓ este formată din 2 subunităţi codificate de genele *him A* şi *him B*,
- ✓ spre deosebire de alte proteine *histone-like*, moleculele de IHF se ataşează la ADN într-o manieră situs-specifică (adică doar la anumite secvenţe de nucleotide)

- ✓ moleculele de IHF nu sunt necesare pentru recombinarea bacteriană omoloagă, dar par să intervină în fenomene de recombinare neomoloagă, specializată, cum sunt de altfel, procesele de transpoziție și de conjugare bacteriană

3.1.6. Secvențe ADN repetate

În cromozomul bacterian au fost identificate secvențe ADN repetate, dintre care unele nu codifică proteine/ARN (secvențe repetate necodificatoare), iar altele codifică o serie de proteine sau specii moleculare de ARN (ARNr, ARNt) – secvențe repetate codificatoare.

3.1.6.1. Secvențe repetate necodificatoare = ADN repetitiv

Acestea sunt reprezentate de secvențe scurte ce apar de regulă în afara ORF-urilor (*Open Reading Frames*). Marea majoritate a acestor secvențe servesc ca situsuri de interacțiune ADN-proteine (inclusiv în procese de recombinare, inversie, excizie, transpoziție) și ca situsuri modificate ce identifică catena matriță în timpul replicării semiconservative a cromozomului bacterian. Dintre cele mai cunoscute asemenea secvențe sunt secvențele *REP, Chi, Dam.*

Secvențe *REP* (*Repeated Extragenic Palindromes*)

Sunt formate din palindroame repetate, majoritatea aflate în regiuni extragenice. O secvență REP conține o secvență consensus de 38 bp. Grupuri (denumite "clusteri") de 2-4 secvențe REP separate între ele prin 20 pb formează un **element REP (REPE** = *REP Element*). La *E.coli* și *Salmonella typhimurium* există 100-200 structuri REPE (reprezentând deci, aproximativ 0.5% din cromozomul bacterian), localizate însa diferit. La secvențele REP se leagă molecule de proteină HU și de ADN girază, aceste secvențe având deci rol în împachetarea nucleoidului. Tot la aceste secvențe se leagă și ADN polimeraza intervenind în procese de replicare și reparare ADN.

Situsuri *Chi* Un situs *Chi* are o lungime de 8 pb:

5' GCTGGTGG 3'

Datorită faptului că reprezintă situsul de recunoaștere și tăiere a moleculelor ADN de către **endonucleaza RecBCD**, secvențele *Chi* stimulează recombinarea omoloagă mediată de **RecA** și **RecBCD**. S-a mai constatat că efectul recombinativ al situsului *Chi* este polar: stimulează recombinarea la capatul 5' al lui *Chi*, și nu la 3'. Situsuri *Chi* au fost identificate atât pe cromozom, cât și pe unele plasmide de la *E.coli*. Mai mult chiar, s-a constatat că secvențele *Chi* reprezintă situsuri de stimulare a recombinării genetice la toți membrii familiei *Enterobacteriaceae*. În contrast, la *Pseudomonadaceae*, complexul enzimatic RecBCD nu acționează la situsuri *Chi*.

În cromozomul de *E.coli* au fost identificate aproximativ 950 de situsuri *Chi*, ce par să fie distribuite relativ uniform (1 situs *Chi* la 5 kbp), cu excepţia zonei adiacente regiunii *oriC*, unde există un cluster de 22 de situsuri *Chi*.

Situsuri *Dam* sunt formate din 4 bp (5' GATC 3') şi reprezintă situsurile de metilare a adeninei (adenina este metilată la poziţia N6). Cromozsomul de *E.coli* conţine foarte multe situsuri *Dam* (peste 18.000) care, dacă ar fi dispuse randomizat ar exista 1 situs *Dam*/250 bp. Şi în acest caz s-a constatat un număr foarte mare de situsuri *Dam* în, şi în jurul, regiunii *oriC*: în cele 245 bp ce definesc *oriC* la *E.coli* există 8 situsuri *Dam*, iar în cele 350 bp ce flanchează *oriC* există încă 12 situsuri *Dam*.

3.1.6.2. Secvenţe repetate codificatoare

Asemenea secvenţe au dimensiuni mult mai mari decât cele necodificatoare.

operoni *rrn* există la toate bacteriile şi cuprind secvenţe ce codifică pentru molecule de ARN ribozomal (ARNr). La cele mai multe dintre speciile bacteriene, *linkage*-ul (ordinea) în cadrul unui operon *rrn* este 16S – 23S – 5S. *E.coli* şi *S.typhimurium* au câte 7 loci (operoni) *rrn*, localizaţi în poziţii echivalente. Cei 7 operoni sunt notaţi ***rrnA....rrnG***, fiecare cuprinzând secvenţe 16S-23S-5S cotranscrise într-o moleculă ARN de 30S. Numărul operonilor *rrn* variază de la un gen/specie bacteriană la alta: *Bacillus subtilis* are 10 operoni *rrn*, *Mycobacterium* sp. are 1-2 operoni *rrn*. Chiar în cadrul aceleiaşi tulpini bacteriene, locii *rrn* pot diferi între ei în ceea ce priveşte prezenţa/absenţa genelor pentru ARNt în regiunile "*spacer*" dintre genele ARNr. Astfel, toţi cei 7 operoni *rrn* de la *E.coli* au 1-2 gene pentru ARNt între secvenţele pentru 16 şi 23S, şi 0-2 gene ARNt după 5S.

Distribuţia locilor *rrn* pe cromozom variază la diverse specii bacteriene: la *E.coli*, majoritatea locilor *rrn* sunt localizaţi în jumătatea cromozomală ce are în centru regiunea *oriC*; la *B.subtilis*, locii *rrn* sunt grupaţi într-o zonă ce reprezintă 30% din cromozom.

genele pentru ARNt

Cromozomul de *E.coli* conţine 41 de gene/operoni pentru ARNt distribuiţi în tot cromozomul. Unii din aceşti operoni codifică pentru o moleculă de ARNt, alţii pentru mai multe molecule de ARNt, iar alţii au şi secvenţe ce codifică diverse proteine.

secvenţe *rhs* ***("rearrangement hot-spots")*** sunt capabile să genereze duplicaţii genice prin procese de crossing-over inegal între secvenţe repetate. La *E.coli* K-12 au fost identificate 4 secvenţe ***rhs***, notate ***rhs A, B, C şi D***. Fiecare din aceste 4 secvenţe au dimensiuni între 8 şi 9 kbp şi sunt compuse dintr-o regiune "*core*" (*miez*) (cu secvenţă conservată de aproximativ 3700 bp) şi din segmente flancatoare. Prin

exprimarea regiunilor "*core*" ale secvenţelor *rhs A, B* şi *C* sunt sintetizate 2 proteine cu funcţie deocamdată necunoscută. În contrast cu *E.coli* K-12, la *E.coli* B şi *E.coli* C, precum şi la *S.typhimurium*, nu au fost descrise secvenţe *rhs*.

3.1.7. Numărul de copii genice

La bacterii, în afară de genele sau operonii aflaţi în copii multiple, numărul de copii ale unei gene cromozomale poate varia în funcţie de următorii factori:

1. *poziţia genei pe cromozom, de-a lungul unui gradient pornind de la oriC spre regiunea ter.* În timpul replicării cromozomului bacterian, în funcţie de poziţia lor pe cromozom, unele gene sunt deja replicate, în timp ce altele încă nu. Astfel, unele gene se găsesc într-un număr mai mare de copii decât altele.

2. *copii ale unei gene cromozomale pot există şi pe plasmide.*

În această situaţie se foloseşte termenul de *meroploidie parţială*, care se referă la o ploidie parţială ce afectează anumite gene, fără să existe multiplii de cromozomi întregi (este cazul genelor prezente şi pe cromozom şi pe un plasmid).

3. *într-o celula bacteriană pot există mai multe copii ale întregului cromosom.*

La anumite specii bacteriene există mai multe copii cromozomale în aceeaşi celulă: *Desulfovibrio vulgaris* (4 copii), *D.gigas* (17 copii), *Azotobacter chroococcum* (20-25 de copii), *A.vinelandii* (40-80 de copii cromozomale).

Este de subliniat faptul că la majoritatea speciilor bacteriene cu copii cromozomale multiple există procese de inactivare cromozomală ce asigură funcţionarea unui singur cromozom şi inactivarea celorlalţi.

3.1.8. Densitatea informaţiei în cromozomul bacterian

Densitatea informaţiei biochimice, adică numărul de reacţii biochimice catalizate per kb de material genetic, este un parametru extrem de variabil în genomul bacterian, în primul rând datorită faptului că nu întotdeauna genele au o relaţie 1-la-1 cu reacţiile biochimice. În mod uzual, este valabilă relaţia 1 genă => 1 polipeptidă => 1 reacţie biochimică. Există însă şi foarte multe excepţii, de exemplu:

- *enzime formate din mai multe lanţuri polipeptidice:* de exemplu, enzima succinat dehidrogenaza este formată din 4 polipeptide codificate de 4 gene diferite – ***sdh A, B, C şi D.*** În acest caz, relaţia este 4 gene =>1 reacţie biochimică;

- *enzime polifuncţionale, ce catalizează mai multe reacţii biochimice*: de exemplu, complexul enzimatic FAD ce oxidează acizii graşi este format din 2 polipeptide codificate de 2 gene diferite – ***fadA şi fadB***. Acest complex enzimatic catalizează 5 reacţii biochimice (din care 4 sunt catalizate de **FadA**). În acest caz, relaţia este 1 genă => 4 reacţii biochimice.

Gene suprapuse

În cadrul genomului bacterian variază şi densitatea de citire a informaţiei genetice prin transcriere. Astfel, deşi marea majoritate a genelor bacteriene sunt contigue, totuşi cromozomul bacterian cuprinde şi gene cu diverse grade de suprapunere:

- *gene cu promotor plasat în regiunea terminală a genei "upstream"*: ***trpA-trpB, ilvA-ilvD***

- *gene cu promotor plasat în interiorul genei "upstream"*: ***mioA-mioD***

- *gene cu grad ridicat de suprapunere*:

1. **gene suprapuse total**, codificate pe cele 2 catene ale ADN; de exemplu, locusul *CysE* (codifică serin-acetil-transferaza), ce este implicat în biosinteza cisteinei, are 2 ORF (***cys X*** şi ***cys E***) codificate pe cele 2 catene ale locusului *CysE*.

2. **secvenţe codificatoare ce sunt folosite de mai multe ori**, pornind transcrierea din poziţii diferite; de exemplu, locusul ***McrB*** (codifică proteine implicate în restricţia ADN la 5-metil-citozină) conţine 3 ORF-uri pe aceeaşi catenă ADN, pornind din 3 situsuri diferite de iniţiere a transcrierii. Traducerea celor 3 transcripte duce la formarea a 3 proteine (de 51, 53 şi, respectiv, 54 kdal) cu secvenţă carboxi-terminală identică, dar diferită în regiunea amino-terminală.

3. **gene suprapuse total**, cu molecule transcript identice, dar traduse diferit prin procese de "*frameshift*" translaţional: de exemplu, gena ***trpR*** care codifică 2 proteine şi gena ***dnaX***, care codifică 2 subunităţi ale ADN polimerazei III.

Asemenea gene – cu grad ridicat de suprapunere – sunt foarte bogate în informaţie genetică (unele au chiar informaţie dublă). Multe din ele (de exemplu, genele ***mcrB*** şi ***dnaX***) nu sunt tipice pentru cromozomul de *E.coli*, în ceea ce priveşte procentul molar de guanină + citozină. Astfel, gena *mcrB* are 48% mol GC, iar gena *dnaX* are 58 % mol GC, în timp ce cromosomul de *E.coli* are, *in toto*, 51-51.5 % mol GC. S-a emis ipoteza că asemenea gene care prezintă un procent molar de guanină + citozină extrem de diferit faţă de media cromosomală, ar fi fost achiziţionate de *E.coli* din alte genomuri, prin procese de transfer de material genetic pe orizontală (transformare, conjugare, transducţie).

3.1.9. Redundanța genelor și a produselor genetice

Pentru foarte multe funcții celulare, există câte 2 gene, ca și cum programul genetic al acestor bacterii ar avea sisteme de "*backup*" (*copii de siguranță*). Această redundanță ar putea fi considerată ca fiind o densitate redusă a informației genetice. Cu toate acestea, cel puțin în unele cazuri, această informație este reglată diferit și folosită în scopuri metabolice diferite.

În cromozomul de *E.coli* există 58 de perechi (de câte 2 gene) sau clusteri (mai mult de 2 gene), ce codifică 125 de produse genice. Din acestea, în 56 de perechi/clusteri reacțiile catalizate sunt identice. În cazul anumitor grupuri genice, reglajul exprimării lor este diferit, de exemplu:

- genele ***aroF, aroG*** și ***aroH*** codifică, toate trei, o aceeași enzimă: 3-deoxi-D-arabino-heptulosonat–7 – fosfat-sintetaza (DAHPaza). Enzima codificată de *aroF* este sensibilă la concentrația de tirozină, cea codificată de *aroG* este sensibilă la concentrația de fenil-alanină, iar cea codificată de *aroH* este sensibilă la concentrația de triptofan ;

- genele ***glpA*** și ***glpD*** codifică amândouă glicerol-3-fosfat-dehidrogenaza. Enzima codificată de *glpA* este sintetizată și folosită în condiții de anaerobioză, iar cea codificată de *glpD* – în condiții de aerobioză.

Unele din aceste gene pereche au secvență similară una cu cealaltă (și proteinele corespunzătoare au secvență similară în aminoacizi) și este probabil că au apărut prin procese de duplicație genică, urmată de o oarecare divergență funcțională.

Altele însă, deși enzimele desfășoară aceeași funcție, totuși au secvență diferită (atât ca proteine, cât și genele corespunzătoare). Este posibil ca asemenea gene să fi apărut fie prin evoluție convergentă, fie prin transfer lateral de la alți repliconi bacterieni (această ultimă situație poate fi identificată prin determinarea procentului molar de guanină + citozină).

3.1.10. Situsuri de inserție fagică în cromozomul bacterian

Mulți bacteriofagi își inseră genomul în cromozomul bacterian, fie prin transpoziție în poziții randomizate în cromozom (bacteriofagul **Mu**), fie prin recombinare situs-specifică numai în anumite poziții (fagii **lambdoizi** ce constituie fagii înrudiți cu fagul). Situsurile cromosomale în care fagul ***lambda*** (și fagii *lambdoizi*) își inseră genomul, sunt denumite situsuri ***attB*** ("***att***achment on ***b***acteria") și corespund unor situsuri ***attP*** ("***att***achment on ***p***hage") pe genomul fagic. Fagul lambda necesită un situs *attB* de minimum 21 bp, din care 15 sunt identice cu 15 bp din *attP* (234 bp). Lambda are un situs preferat *attB* în cromozomul de *E.coli* K-12 (dar și situsuri secundare) ce e situat intergenic. Alți fagi lambdoizi (***21, e14, P22***) se inserează în situsuri attB cu localizare intragenică.

Pe cromozomul de *E.coli* K-12 au fost cartate situsurile pentru 15 fagi lambdoizi şi s-a constatat că ele sunt grupate între poziţiile 6 min şi 44 min.

Această organizare a situsurilor în care se inseră genomul fagilor lambdoizi reprezintă încă un argument în favoarea ipotezei conform căreia cromozomul de *E.coli* (şi nu numai) ar avea o origine himerică, unul din segmente derivând dintr-o gazdă ancestrală a fagilor lambdoizi.

Pe de altă parte, s-a constatat că foarte multe elemente genetice cu caracter "mobil" se inseră în genele pentru ARNt, fapt pentru care s-a sugerat că acestea ar fi reprezentat situsurile folosite de fagii ancestrali.

3.1.11. Localizarea cromozomală a genelor înrudite fiziologic

În cromozomul de *E.coli*, majoritatea genelor (operonilor) par să fie distribuiţi randomizat (indiferent de înrudirea lor fiziologică), cu excepţia celor implicaţi în catabolismul glucozei ce par să fie dispuşi în 4 zone echidistante pe harta circulară a cromozomului. Această randomizare a dispunerii operonilor a fost verificată şi prin rearanjamente cromozomale induse experimental – caz în care operonii au continuat să funcţioneze normal.

Totuşi, în treimea cromosomală ce are în centru regiunea ***ter*** (ca, de altfel, şi în regiunea ***oriC***), poziţia operonilor pare să fie destul de fixă, orice rearanjament deranjând total funcţionarea acestora. Orice aranjament nerandomizat al genelor duce la ipoteza că poziţia genelor ar putea afecta funcţionarea lor, deducându-se astfel o organizare mai înaltă decât operonul sau reglonul.

La cele mai bine studiate specii de *Pseudomonas* (*P.aeruginosa, P.putida*) s-a constatat că genele cu funcţii "*housekeeping*" (gene implicate în metabolismul central al oricărei celule, precum şi în metabolismul anabolic) sunt grupate în jumătate din harta circulară a cromozomului. În acelaşi timp, genele implicate în metabolismul catabolic par să fie dispuse randomizat în cealaltă jumătate a cromozomului bacterian.

Acest mod de dispunere a genelor ar putea reflecta istoria construcţiei cromozomului din părţi separate: genele pentru metabolismul esenţial ar fi existat probabil în acel genom ancestral mai mic, care a fost ulterior mărit la actuala dimensiune prin fuziune cu un alt element genetic sau prin transfer de material genetic (transformare, conjugare, transducţie).

În general, s-a constatat că la foarte multe bacterii clusterii genici din jurul regiunilor *oriC* şi *ter* sunt foarte similari între taxoni bacterienei foarte îndepărtaţi filogenetic, fapt ce susţine ipoteza că iniţierea şi terminarea replicării cromozomului bacterian sunt procese extrem de vechi şi sunt coordonate prin mecanisme similare la marea majoritate a bacteriilor.

3.2. PLASMIDE BACTERIENE

În prezent, plasmidele sunt definite ca fiind repliconi neesenţiali, capabili să se replice fizic independent de cromozom şi transmişi în formă extracromosomală, pe verticală (de la o generaţie de indivizi la alta) sau pe orizontală (de la un individ la altul în cadrul aceleiaşi generaţii). În general, plasmidele reprezintă un fenomen al lumii procariote. Cu toate acestea, au fost descrise structuri genetice plasmidiale şi la unele grupuri de eucariote inferioare (drojdii, fungi, mucegaiuri) şi chiar şi la eucariote superioare (plasmidele din mitocondrii şi cloroplaste la unele celule vegetale).

Exista cercetători care încadrează plasmidele în categoria organismelor acelulare. În contrast cu această teorie, alţi cercetători consideră plasmidele ca nefiind organisme, ci alături de virusuri, transposoni şi secvenţe de inserţie, ar aparţine unor specii moleculare speciale, de elemente genetice mobile (ADN accesoriu) (P. Sykora 1992).

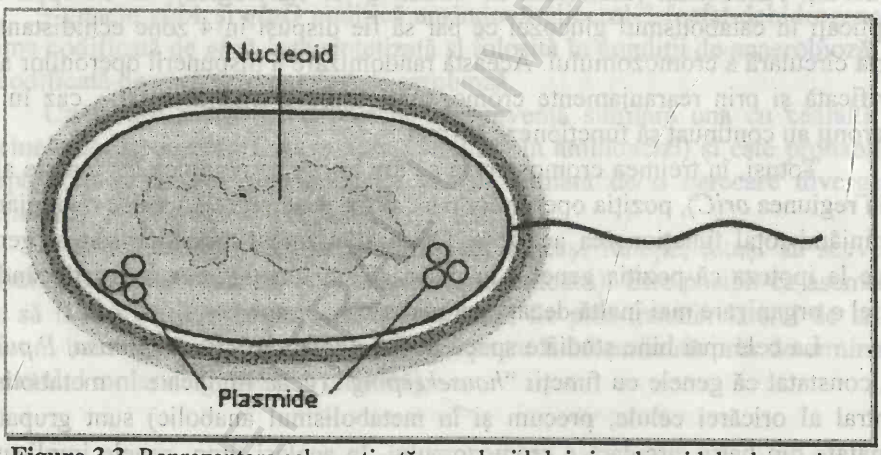


Figure 3.3. Reprezentare schematizată a nucleoidului şi a plasmidelor bacteriene.

3.2.1. Principalele categorii de gene codificate de plasmide

Fiind repliconi fizic independenţi, toate plasmidele poartă gene implicate în propria **replicare, stabilitate** şi **partiţie**. În afară de acestea, majoritatea genelor codificate de plasmide conferă caractere adaptative, avantajoase gazdelor bacteriene. Cele mai frecvente categorii de gene purtate de plasmide sunt :

- *gene de rezistenţă la antibiotice*

Plasmidele de rezistenţă au fost descoperite în Japonia în anii 50 la izolate clinice de *Shigella dysenteriae* şi s-a constatat că aceste gene nu erau plasate pe cromosomul bacterian. Au fost denumite factori R. Folosirea abuzivă şi/sau incorectă a antibioticelor au

determinat, pe de o parte, răspândirea în populaţiile de bacterii patogene a determinanţilor de antibiorezistenţă, iar pe de altă parte, dezvoltarea unor mecanisme de antibiorezistenţă extrem de eficiente.

În ceea ce priveşte originea genelor de antibiorezistenţă, au fost emise 2 ipoteze majore:

a-genele de antibiorezistenţă existente în prezent în foarte multe bacterii patogene ar avea originea în gene similare prezente în bacteriile ce produc antibiotice (şi care, de regulă, sunt bacterii din sol); în această situaţie se presupune că ar fi avut loc evenimente de transfer de gene pe orizontală între bacterii din sol şi bacterii patogene;

b-genele de antibiorezistenţă ar fi evoluat din gene *"house-keeping"* (de exemplu: proteinele ce efluxează tetraciclina ar putea să fi evoluat din proteinele de transport al nutrienţilor).

- gene de toleranţă la metale grele (ioni mercurici, derivati organomercurici, nichel, cobalt, plumb, cadmiu, bismut, antimoniu, zinc, argint)
- gene de rezistenţă la agenţi intercalanţi, radiaţii UV, radiaţii X, bacteriofagi, bacteriocine
- gene ce codifică factori de patogenitate şi de virulenţă
- gene ce codifică bacteriocine
- gene ce codifică antibiotice
- gene implicate în metabolismul opinelor (plasmidele ***Ti*** de la *Agrobacterium*)
- gene ce codifică capacităţi metabolice deosebite, de exemplu folosirea unor substanţe xenobiotice ca sursă unică de carbon şi energie la specii de *Pseudomonas*
- gene fixatoare de azot (genele ***nif*** de la *Rhizobium* şi *Bradirhizobium*)
- gene ce codifică enzime proteolitice, amilolitice etc
- gene ce codifică transferul plasmidelor pe orizontală prin proces de conjugare bacteriana (regiunea ***tra***)

Deci, în afară de genele implicate în propria replicare, stabilitate şi partiţie, plasmidele mai pot purta şi gene ce codifică caractere - unele esenţiale, altele neesenţiale pentru bacteria gazdă. **Caracterele esenţiale** reprezintă căi metabolice centrale ale celulei bacteriene, plasmidele purtătoare fiind prezente la marea majoritate a izolatelor naturale ale unor tulpini bacteriene (de exemplu, unele plasmide mari de la *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum*).

Unele **caractere neesenţiale** conferă avantaje selective gazdelor purtătoare, permiţând supravieţuirea acestora în anumite condiţii de mediu. În această categorie intră genele plasmidiale ce codifică rezistenţa la antibiotice şi toleranţa la metale grele (asemenea gene sunt prezente la multe tulpini de bacterii patogene). În absenţa antibioticelor sau a metalelor grele ca factori de presiune selectivă, procesele de replicare, menţinere şi partiţie a plasmidelor reprezintă un efort

metabolic suplimentar pentru celulele bacteriene. Ca urmare, în doar câteva pasaje, aceste plasmide sunt eliminate din populația bacteriană prin subreplicare. Ele se mențin doar într-o proporție scăzuta a populației bacteriene, fapt ce ar putea fi considerat o "economie" metabolică la nivelul întregii populații bacteriene.

Există însă și așa-numite **plasmide "criptice"**, care nu par să ofere gazdei nici un caracter avantajos. Interesant este faptul că, deși pot fi încadrate în categoria *"selfish DNA"* (*"ADN egoist"*), totuși și aceste plasmide sunt menținute într-o anumită proporție din populațiile bacteriene.

În ansamblu, genomul bacterian se caracterizează printr-o **intensă circulatie pe orizontală** a genelor, între diverși indivizi bacterieni (H.Tschape 1994). Această circulație se desfășoară prin trei procese centrale - **conjugare, transformare și transducție** - dintre care, plasmidele sunt implicate în primele două.

Acest flux continuu de gene pare să fie o caracteristică definitorie a lumii bacteriene și să fi contribuit esențial la extrema versatilitate metabolică a bacteriilor în aproape toate mediile naturale.

3.2.2. Clasificarea plasmidelor

Plasmidele pot fi clasificate funcție de diverse criterii :

a) *criteriul autotransferabilității.* Autotransferabilitatea reprezintă capacitatea unui element genetic (în speță, un plasmid) de a se autotransfera de la un individ bacterian la altul. De regulă, genele implicate în autotransferabilitate sunt grupate într-un operon (denumit operon *tra*), iar elementul genetic purtător este denumit ***conjugon***. Conform acestui criteriu există 3 clase de plasmide :
   1) **plasmide conjugative** – sunt plasmidele care prezintă întreg operonul *tra* și sunt autotransferabile, putând genera proces de conjugare bacteriană;
   2) **plasmide non-conjugative** – sunt plasmidele ce nu prezinta operonul *tra,* nu sunt autotransferabile (nu pot genera conjugare bacteriană) și nici mobilizabile;
   3) **plasmide mobilizabile** – sunt plasmidele ce nu prezinta operonul *tra* (și, ca atare, nu sunt autotransferabile), dar au gene ***mob*** care le permit mobilizarea în evenimente de conjugare inițiate de alte plasmide ce sunt conjugative.

b) *criteriul structurii moleculare.* Marea majoritate a plasmidelor sunt formate din ADN dublu catenar. Mai mult decât atât, din punct de vedere al structurii moleculare, exista două clase de plasmide :
   1) plasmide circulare. Plasmidele circulare sunt alcătuite din ADN d.c. circular, iar forma *in vivo* pare sa fie CCC (*"circular covalently closed"*); foarte rar și temporar se întâlnește forma CO (*"circular open"*), în care una din cele două catene nu este

continuă având o legătură fosfodierica lipsă. Tot *in vivo* se mai întâlnesc şi concatemeri (oligo/multimeri).

2) plasmide lineare. Asemenea plasmide sunt alcătuite din ADN d.c. linear (L). Au fost descrise două tipuri de plasmide lineare :

1. *Plasmide lineare cu telomere hairpin* (telomere în ac-de-păr). Acestea sunt întâlnite cu precădere la plasmidele lineare de la *Borrelia* (Figura 3.3). Spirochetele din genul *Borrelia* au structură genomică lineară: toate speciile de *Borrelia* examinate au un cromosom linear de 950-1000 kb şi mai multe plasmide lineare cu dimensiuni cuprinse între 5 şi 200 kb (unele au şi plasmide CCC). Toate plasmidele lineare de la *Borrelia* descrise până în prezent au telomere de tip *hairpin*. Telomerele *hairpin* se caracterizează prin palindroame terminale bogate în A/T, la capete existând o continuitate în legatura de tip covalent între cele 2 catene. Asemenea structuri (ADN d.c. L cu telomere de tip *hairpin*) mai există şi la ADNmt de la reprezentanţii genului *Pichia*, la poxvirusuri şi la plasmidele lineare din mitocondriile de fungi.

2. *Plasmide cu telomere invertroni* Asemenea telomere sunt întâlnite la plasmidele lineare de la genul *Streptomyces* – plasmide cu dimensiune cuprinsă între 9 şi 600 kbp. Ca şi cele *hairpin*, telomerele *invertroni* prezintă şi ele palindroame terminale bogate în A/T. Diferenţa constă însă în faptul că nu există legatura covalentă între capetele celor 2 catene, şi, ca urmare, capetele 5' şi 3' sunt libere. La capul 5' al fiecărei catene este ataşată covalent o moleculă proteică denumită ***proteina TP*** (*"Telomeric Protein"*) (Figura 3.3). Asemenea structuri ADN, cu palindroame terminale bogate în A/T şi cu proteina TP ataşată covalent la capul 5' au fost definite de K.Sakaguchi (1990) ca fiind *elemente genetice mobile cu replicare autonoma* şi denumite INVERTRONI, similare funcţional cu transposonii.

Telomerele *invertroni* sunt caracteristice repliconilor lineari de la eucariote, în mod special la plasmidele lineare din mitocondriile de fungi şi plante şi din citoplasma de fungi.

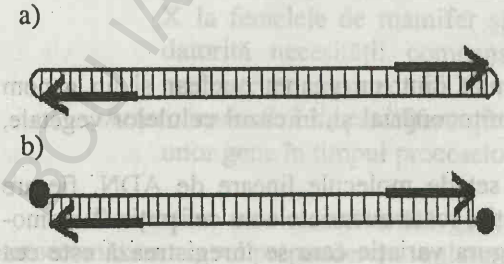


Figura 3.4 Structura telomerelor *hairpin* la *Borrelia* (a) şi invertroni la *Streptomyces* (b) (dupa H.Hinnebusch, 1992).

palindroame terminale, bogate în A-T

= la capul 5' al fiecărei catene există o proteină ataşată covalent

c) *criteriul incompatibilității plasmidiale*

De-a lungul anilor, **conceptul de incompatibilitate plasmidială** a ridicat foarte multe probleme. Actualmente, acest concept este definit ca fiind incapacitatea a două sau mai multe plasmide de a se menține și propaga stabil în aceeași linie celulară. Plasmidele din același grup de incompatibilitate ce conțin origini de replicare similare (deci, au același *replicon-type*), nu sunt moștenite stabil în descendență și segregă una de cealaltă. Cel mai probabil acest proces se datorează unei competiții moleculare între plasmide cu același *replicon-type* pentru aceleași proteine implicate în replicarea respectivelor plasmide – proteine codificate cromozomal. La *Enterobacteriaceae* au fost descrise peste 30 de grupuri de incompatibilitate plasmidială. Un tip de incompatibilitate s-ar baza pe competiția între secvențele repetate RS (la care se atașează proteina *RepA*), dintre diferite plasmide existente în celula bacteriană. Bazându-se pe tipul de replicon a fost imaginată o metodă nouă de identificare plasmidială folosind o colectie de sonde *rep* (Sykora P. 1992).

Procesul de **"gene-flow"** în lumea bacteriană ar putea avea un rol important în evoluția bacteriilor. Cu toate acestea, procesele de transfer de material genetic pe orizontală nu par să afecteze stabilitatea speciilor taxonomice bacteriene. Din acest punct de vedere, plasmidele se găsesc intr-o situație total diferită: "gene-flow"-ul între plasmide neînrudite pare să fie atât de ridicat și de răspândit, încât nu se poate alcătui o identificare taxonomică a plasmidelor doar pe baza unei liste a caracterelor pe care le codifică. Se pare că biologia plasmidelor nu implică mecanisme de izolare taxonomică asemănătoare cu speciile de plante și animale. În contrast, în lumea plasmidelor se observă un fenomen total diferit: izolarea plasmidelor individuale sau foarte asemănătoare. Acest fenomen este cunoscut ca fenomenul de ***incompatibilitate plasmidială.***

3.3. STRUCTURA CROMOZOMULUI LA EUCARIOTE

Materialul genetic este reprezentat dintr-un genom nuclear și un genom extranuclear (reprezentat din genomul mitocondrial și, în cazul celulelor vegetale, și din genom cloroplastic).

Genomul nuclear cuprinde un set de molecule lineare de ADN, fiecare reprezentând un cromozom. Fără excepție, toate eucariotele au cel puțin 2 cromozomi care întotdeauna sunt lineari. Singura variație care se înregistrează este cea referitoare la numărul de cromozomi, care însă nu este corelată cu caracteristicile

biologice sau cu poziţia evolutivă a organismului respectiv. Astfel, la *Saccharomyces cerevisiae* (drojdia de bere - un eucariot unicelular, inferior) numărul haploid de cromozomi este 16, de 4 ori mai mare decât la muscă (*Musca domestica*). De asemenea, numărul de cromozomi nu este corelat nici cu dimensiunea genomului; de exemplu, la salamandră genomul este de 30 ori mai mare decât la om, dar are jumătate din numărul haploid de cromozomi de la om.

Cromozomii eucarioţi sunt separaţi de citoplasmă prin membrana nucleară şi, ca urmare, transcrierea şi traducerea sunt separate în timp şi spaţiu una de cealaltă; în contrast, la procariote, cele două procese se de sfăşoară aproximativ simultan.

Nucleul este format din 4 componente: *nucleolemă*, *carioplasmă*, *cromonemata* (singular, cromonema) şi *nucleol*. Cromonemata este o substanţă cromatică despiralizată în interfază şi condensată în mitoză. Din această substanţă se diferenţiază cromozomii.

Nucleolul este o substructură nucleară cu rol în biogeneza ribozomilor. În această zonă a nucleului are loc sinteza de ARN ribozomal prin transcrierea genelor corespunzătoare.

La eucariote ADN este complexat cu o clasă de proteine specializate, cu caracter bazic, denumite histone. Acest complexpoartă numele de **cromatină** (denumirea are la bază tinctorialitatea faţă decoloranţi bazici).

Cromatina se prezintă sub 2 stări:
- **eucromatina** – cromatină decondensată în interfază şi condesată în timpul diviziunii celulareş se replică la începutul fazei S a interfazei
- **heterocromatina** – condensată permanent şi se replică la sfârţitul fazei S.

Heterocromatina se clasifică în:
- ***heterocromatină constitutivă*** – este caracteristică zonelor centromerice şi telomerice
- ***heterocromatină facultativă*** - este caracteristică unuia din cromozomii X la femelele de mamifer şi constituie cromatina sexuală; apare datorită necesităţii compensaţiei de doză a genelor esenţiale prezente pe cromozomul X
- ***heterocromatină de citodiferenţiere*** – apare prin inactivarea selectivă a unor gene în timpul proceselor de citodiferenţiere

Eucromatina este caracteristică genelor active transcripţional, în timp ce heterocromatina are rol preponderent reglator şi structural.

3.3.1. Clase de secvenţe ADN la eucariote

1. **secvenţe unice**, o copie per genom haploid, corespunzătoare genelor codificatoare pentru lanţuri polipeptidice, excepţie făcând genele ce codifică histone, care se găsesc în câtevasute de copii per genom haploid (este necesară o sinteză rapidă într-un timp scurt corespunzăzoare perioadei S de replicare a ADN).
2. **secvenţe moderat repetitive**: sunt intr-un număr de $10^2 - 10^3$ copii per genom haploid şi codifică pentru ARN ribozomal, ARN de transfer şi pentru histone.
3. **secvenţe înalt repetitive**: ajung până la 10^6 copii per genom haploid

În general, eucariotele conţin mult mai mult ADN decât procariotele. O celulă de om conţine de peste 1000 de ori mai mult ADN decât o celulă de *Escherichia coli*. Astfel, ADN-ul dintr-o celulă de om, aflat în stare decondensată atinge o lungime de 4 cm şi nu poate încăpea într-un nucleu (de diametru 5 □m) decât în formă condensată.

Forma cromozomilor dintr-o celulă eucariotă se modifică în timpul ciclului celular.

3.3.2. Proteinele cromozomale

Principalele proteine ce complexează ADN-ul au greutate moleculară mică, o cantitate mare de aminoacizi cu caracter bazic şi se numesc histone. Au fost descrise 5 clase de histone: H1 H2A, H2B, H3 şi H4.

Histona H1 este alcătuită din 3 domenii structurale distincte:

- un capăt amino-terminal cu 39 aminoacizi bazici
- o regiune globulară centrală cu un diametru de 2,8 nm, cu aminoacizi cu caracter acid; interacţionează cu alte proteinexi-terminal ce conţine 40% lizină (cu puternic caracter bazic) şi are afinitate de interacţiune cu molecula de ADN.

Histonele H2A şi H2B au cantitate mai redusă de lizină. H2A are leucină, iar H2B are serină şi prolină. Au doar 2 domenii, dintre care unul interacţionează cu ADN.

Histonele H3 şi H4 sunt bogate în arginină şi, în mod similar cu H2A şi H2B, au tot doar 2 domenii funcţionale.

În general, histonele prezintă o structură înalt conservată în lumea vie. Cea mai heterogenă este histona H1, acest parametru scăzând de la H1 către H4.

Genele pentru histone sunt organizate în unităţi repetitive dispuse în tandem. De exemplu, la *D.melanogaster* unitatea repetitivă este formată din genele pentru:

H1 – H3 – H4 – H2A – H2B

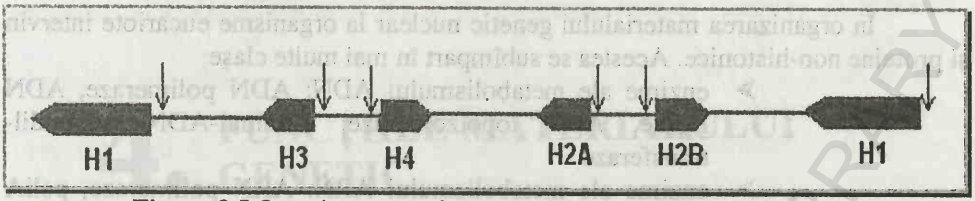


Figura 3.5 Organizarea genelor pentru histone la *D.melanogaster*. regiuni[II] reglatoare ale genelor (situsuri hipersensibile la nuclează)

3.3.3. Nivelele de organizare ale cromatinei

Elementul structural de bază al cromatinei este **nucleozomul** care este format dintr-un octamer histonic central şi o histonă de legătură (*linker*). Nucleozomul are 145 perechi de baze corespunzătoare la aproximativ 2 ture de spiră suprarăsucite negativ în jurul miezului histonic. Miezul histonic prezintă domeniul hidrofob carboxi-terminal de interacţiune cu celelalte proteine spre partea centrală, iar domeniul amino-terminal se găseşte la suprafaţa de interacţiune cu ADN.

Între 2 nucleozomi adiacenţi se interpune ADN linker de 60 perechi de baze şi este complexat cu histona H1.

Cromatina extinsă apare ca un şirag de mărgele cu un diametru de 11 nm. Prin intermediul histonei H1 implicată în superspiralizare interacţionează 6 – 10 nucleozomi pentru a forma solenoidul de 30 nm. Acesta este unitate de bază a condensării materialului genetic in interfază.

Forma superioară de condensare este reoprezentată de cromozomii metafazici, perioada în care materialul genetic atinge un nivel maxim de condensare de 1400 nm. Procesul de condensare a cromatinei este realizat prin ataşarea ei la o clasă de proteine denumite „proteine scaffold" (proteine de eşafodaj). Ataşarea se realizeară cu formarea unor bucle (domenii) care au fiecare 100 kpb, comparabile cu cele de la cromozomul bacterian.

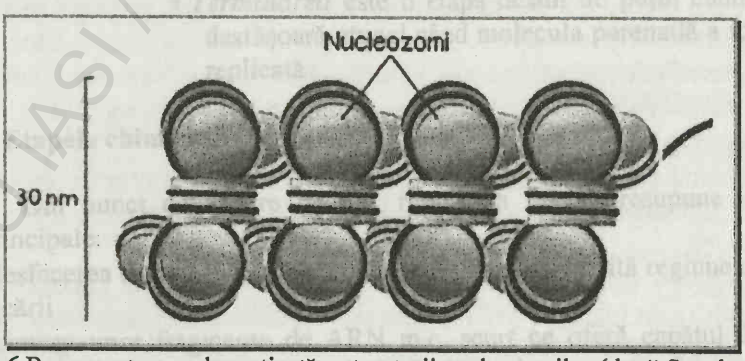


Figura 3.6 Reprezentarea schematizată a structurii nucleosomilor (după Strachan, 1999).

În organizarea materialului genetic nuclear la organisme eucariote intervin şi proteine non-histonice. Acestea se subîmpart în mai multe clase:

- enzime ale metabolismului ADN: ADN polimeraze, ADN ligaze, ADN topoizomeraze, terminal-ADN-nucleotidil-transferaze
- enzime ale metabolismului ARN: ARN polimeraze, poliA polimeraze, enzime de *splicing*, RNaze
- enzime ce modifică histonele: protein-kinaze, metilaze, acetilaze, esteraze, proteaze
- proteine structurale: proteinele fusului de diviziune, proteinele matricei nucleare, proteinele „*scaffold*", proteinele particulelor RNP („*RiboNucleoProtein*")
- proteinele HMG (*High Mobility Group*) ce intervin în modificarea structurii cromatinei în vederea funcţionării genelor în replicare şi transcriere:
  - HMG 1 şi HMG 2 – proteine omoloage cu g.m. 29 kd;
  - HMG 14 şi HMG 17 - proteine omoloage cu g.m. 10-12 kd

Proteinele HMG înlocuiesc histona H1 determinând, alături de topoizomeraze, relaxarea helixului ADN în iniţierea transcrierii genelor.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. FUNCȚIILE MATERIALULUI GENETIC

4.1. REPLICAREA ADN

Replicarea ADN reprezintă transmiterea fidelă a informației genetice la celulele fiice, în urma diviziunii celulare. Replicarea este una dintre cele două funcții esențiale ale materialului genetic. Mai mult decât atât, replicarea ADN este procesul de bază al continuității vieții pe Pământ.

4.1.1. Principalele etape ale replicării ADN

Ca şi alte procese din biologia moleculară, şi procesul de replicare se desfăşoară în 3 etape – inițierea, elongarea şi terminarea:

- ***Inițierea*** implică recunoaşterea regiunii de pe o moleculă ADN unde va începe procesul de replicare
- ***Elongarea*** cuprinde evenimetele ce se desfăşoară la o bifurcație de replicare, unde catenele parentale sunt copiate ăn catene fiice
- ***Terminarea*** este o etapă destul de puțin cunoscută şi se desfăşoară atunci când molecula parenatlă a fost complet replicată

Etapele chimice ale replicării ADN

Din punct de vedere chimic, replicarea ADN presupune următoarele etape principale:

→ desfacerea inițială a dublului helix într-o zonă denumită regiune de origine a replicării

→ sinteza unor fragmente de ARN m.c. scurt ce oferă capătul 3'-OH liber pentru sinteza primelor legături fosfo-diesterice; aceste fragmente poartă

numele de **primeri** şi sunt sintetizate de ARN polimeraze speciale denumite *primaze*

→ în bucla de ADN desfăcut procesul de replicare se va desfăşura în ambele direcţii, formându-se deci 2 bifurcaţii de replicare

→ în faţa fiecărei bifurcaţii de replicare dublul helix va fi desfăcut prin intervenţia *topoizomerazelor* (care derăsucesc dublul helix) şi a *helicazelor* (care desfac legăturile de hidrogen dintre cele 2 catene); astfel, bucla de replicare se va lărgi în fiecare din cele 2 capete

→ fiecare din cele 2 catene ale helixului parental va servi drept matriţă pentru sinteza unei catene noi

→ sinteza catenelor noi se realizează de către enzime numite **ADN polimeraze**, pe bază de complementaritate cu catena veche folosită ca matriţă; nucleotidele sunt legate între ele prin formarea de legături fosfo-diesterice; alungirea catenei noi se realizează în direcţie 5' – 3'

→ datorită faptul că ADN polimerazele nu pot sintetiza o catenă nouă decât în direcţie 5' – 3', la fiecare bifurcaţie de replicare, sinteza celor 2 catene noi are loc oarecum diferit :

→ una din catenele noi este sintetizată continuu, pornind de la un singur primer: această catenă este denumită **catena conducătoare** (*„leading"*) (Figura 4.1)

→ cealaltă catenă este sintetizată discontinuu, pe măsură ce dublul helix parental este desfăcut în continuare; această catenă este denumită **catenă întârziată** (*„lagging"*) şi este formată din multe fragmente distincte, denumite fragmente Okazaki (de la numele celul care le-a descris prima oară) de aproximativ 100 nucleotide; fiecare asemenea fragment este iniţiat de la un primer

→ într-o fază mai avansată a replicării primerii sunt îndepărtaţi atât din structura catenei conducătoare, cât şi din cea întîrziată, după care golurile sunt umplute tot de o ADN polimerază

→ aceste fragmente sunt apoi unite între ele prin refacerea legăturilor fosfo-diesterice de către o *ADN ligază*

→ în timpul procesului de replicare monocatenele ADN (atât cele vechi, cât şi cele nou sintetizate) sunt stabilizate şi protejate de acţiunea nucleazelor, de către o clasă specială de proteine numite **proteine Ssb** (*Single Stranded Binding*)

→ terminarea replicării unei molecule de ADN diferă între moleculele circulare şi cele lineare

→ la moleculele circulare, întâlnite în majoritatea cazurilor la cromozomul bacterian şi la plasmide, cele 2 bifurcaţii de replicare se întâlnesc într-o regiune denumită *ter*.

→ la moleculele ADN lineare din cromozomii de la eucariote, capetele acestora (**telomerele**) sunt replicate printr-un mecanism diferit, iar fragmentele sunt apoi unite de ADN ligaze

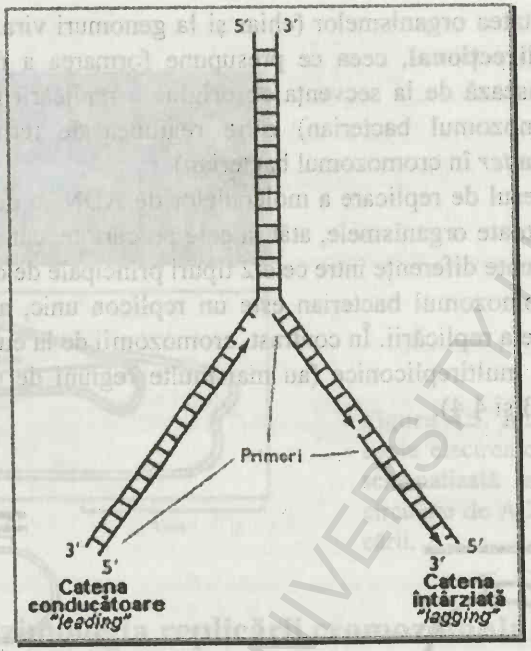


Figura 4.1 Reprezentarea schematizată a unei bifurcații de replicare.

Complementaritatea dintre bazele azotate de pe cele 2 catene ale moleculei de ADN determină o structură perfect adaptată funcției de replicare, fiecare dintre cele 2 catene servind drept matriță pentru sinteza unei catene complementare.

În majoritatea cazurilor, replicarea se realizează pe model **semiconservativ**, macromoleculele de ADN fiice fiind formate dintr-o catenă veche și una nouă (Figura 4.2).

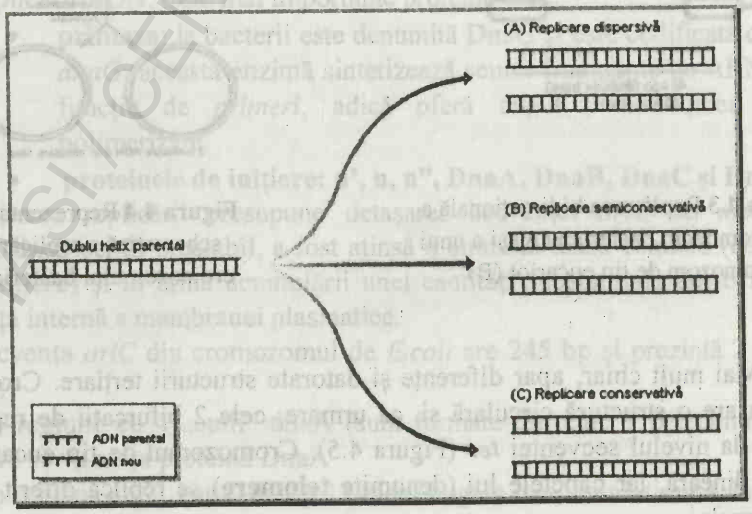


Figura 4.2 Principalele trei modele de replicare a moleculelor ADN.

BCU IAȘI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

La majoritatea organismelor (chiar şi la genomuri virale) replicarea ADN se desfăşoară **bidirecţional**, ceea ce presupune formarea a **două bifurcaţii de replicare** ce avansează de la secvenţa de origine a replicării (denumită secvenţă *oriC* pentru cromozomul bacterian) către regiunea de terminare a replicării (denumită secvenţa *ter* în cromozomul bacterian).

Deşi procesul de replicare a moleculelor de ADN se desfăşoară enzimatic în mod similar la toate organismele, atât la cele procariote, cât şi la cele eucariote, totuşi există suficiente diferenţe între cele 2 tipuri principale de organisme.

Astfel, cromozomul bacterian este un replicon unic, adică are o singură secvenţă de origine a replicării. În contrast, cromozomii de la eucariote sunt fiecare dintre ei structuri multirepliconice (au mai multe regiuni de origine a replicării ADN) (Figurile 4.3 şi 4.4).

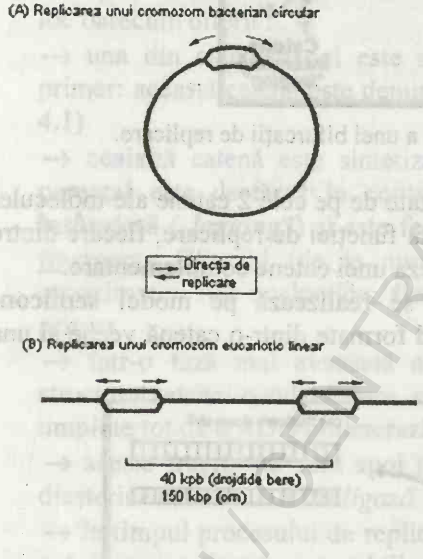


Figura 4.3 Replicarea bidirecţională a unui cromozom bacterian (A) şi a unui cromozom de tip eucariot (B)

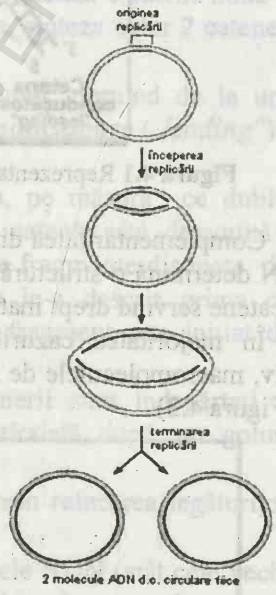


Figura 4.4 Reprezentarea schematică a replicării cromozomului bacterian.

Mai mult chiar, apar diferenţe şi datorate structurii terţiare. Cromozomul bacterian are o structură circulară şi, ca urmare, cele 2 bifurcaţii de replicare se întâlnesc la nivelul secvenţei *ter* (Figura 4.5). Cromozomul de tip eucariot are o structură lineară, iar capetele lui (denumite **telomere**) se replică diferit de restul cromozomului.

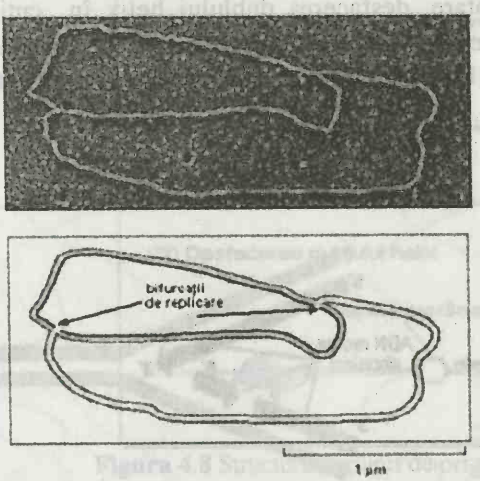


Figura 4.5. Imaginea de microscopie electronică și reprezentarea schematizată a unei molecule circulare de ADN în timpul replicării.

4.1.2. Enzimologia replicării cromozomului bacterian

Cercetările asupra procesului de replicare a moleculei ADN precum și asupra enzimelor implicate au debutat pe cromozomul de *Escherichia coli* și, ca urmare, majoritatea datelor experimentale provin de la bacterii (Figura 4.6).

4.1.2.1. Complexul primozom

Complexul **primozom** este format dintr-o serie de proteine ce determină inițierea replicării ADN. Cele mai importante proteine sunt:

- **primaza:** la bacterii este denumită DnaG și este codificată de gena *dnaG*; această enzimă sintetizează scurte fragmente de ARN ce au funcție de *primeri*, adică oferă capul 3'-OH liber pentru polimerizare.
- **proteinele de inițiere: n', n, n", DnaA, DnaB, DnaC și DnaT**

Inițierea replicării presupune detașarea secvenței *oriC* de membrana plasmatică, după ce, în prealabil, a fost atinsă o anumită masă celulară (denumită *masă de inițiere*) și în urma acumulării unei cantități substanțiale de fosfolipide acide pe fața internă a membranei plasmatice.

Secvența *oriC* din cromozomul de *E.coli* are 245 bp și prezintă 2 regiuni importante:

– o regiune cu 4 „cutii" dnaA (sunt formate din câte 9 bp, denumite 9-meri) la care se va atașa proteina DnaA

– o regiune cu 3 „cutii" de tip 13-meri, bogate în adenină-timină, la care se vor atașa complexe proteice DnaB-DnaC

Zece până la 12 molecule de DnaA se leagă la „cutiile" dnaA, determinând buclarea moleculei de ADN şi, ca atare, desfacerea dublului helix în „cutiile" dnaB. Zonele monocatenare apărute se complexează cu proteina DnaB (cu funcție de helicază), adusă de proteina DnaC. Ulterior, primaza (DnaG) începe aici sinteza moleculelor de ARN primeri (Figura 4.7).

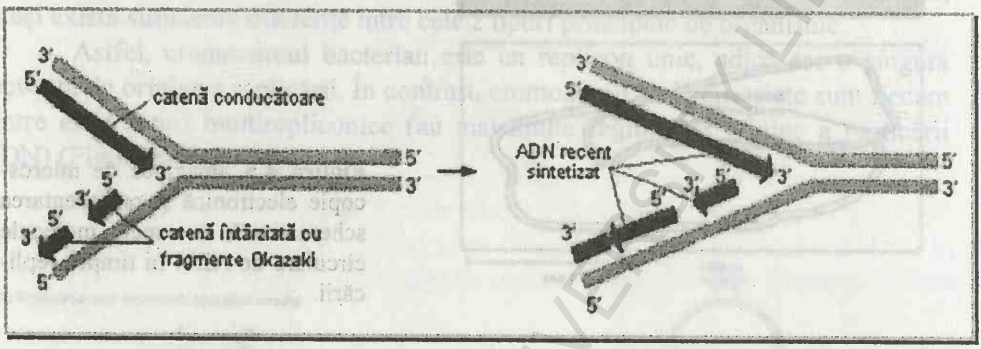


Figura 4.6 Reprezentarea schematică a unei bifurcații de replicare.

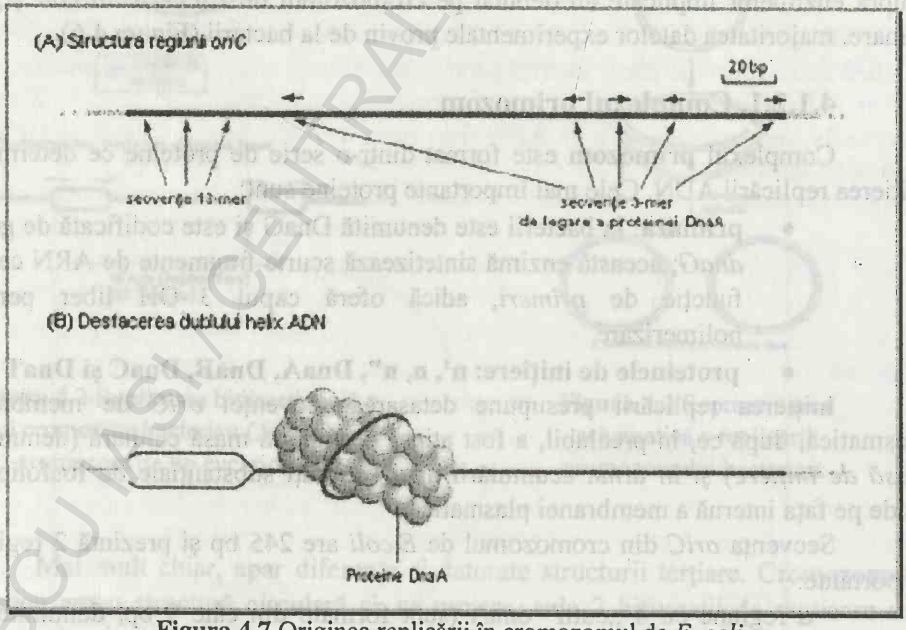


Figura 4.7 Originea replicării în cromozomul de *E. coli*.

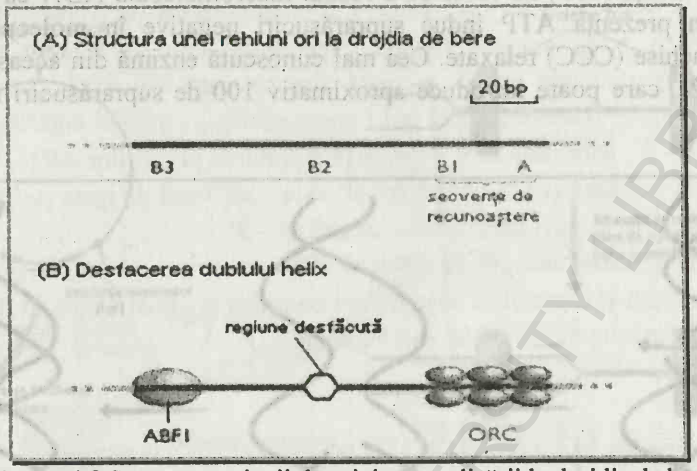


Figura 4.8 Structura regiunii de origine a replicării la drojdia de bere (*Saccharomyces cerevisiae*).
(A) Structura secvenţei ARS1, o secvenţă ARS tipică de la S.cerevisiae, cu poziţionarea secvenţelor funcţionale A, B1, B2 şi B3. Desfacerea dublului helix are loc în regiunea B2 prin ataşarea proteinei ABF1 la regiunea B3. Proteinele complexului de origine a replicării sunt ataşate permanent la regiunile A şi B1.

În procesul de replicare a ADN, în diverse etape, apar zone monocatenare ce sunt stabilizate (şi „apărate") faţă de acţiunea nucleazelor prin ataşare de proteine de tip Ssb (*Single Stranded Binding* – proteine ce se ataşează la monocatene ADN).

4.1.2.2. Topoizomerazele

Superspiralizarea cromzomului bacterian impune intervenţia unor enzime care să realizeze relaxarea dublului helix ADN. Aceste enzime se numesc **topoizomeraze** şi acţionează asupra topoizomerilor ADN (Figura 4.9). Topoizomerii sunt molecule ADN cu structură primară şi secundară identică şi care diferă în structura terţiară.

Două molecule ADN d.c. ce au aceeaşi secvenţă de nuceotide dar număr diferit de înlănţuiri şi suporarăsuciri sunt topoizomere datorită diferenţelor de natură topologică.

La bacterii, ca de altfel şi la eucariote, există 2 clase de topoizomeraze cu mecanisme diferite de acţiune (Figura 4.9) :

- ***topoizomeraze tip I*** – induc rupturi monocatenare (şi tranzitorii) în ADN
- ***topoizomeraze tip II*** – induc rupturi bicatenare în ADN (Figura 4.10)

La bacterii, topoizomeraza de tip I cea mai bine caracterizată este TopA de la *E.coli*, care relaxează suprarăsuciri negative înalt răsucite. Topoizomerazele de

tip II, în absența ATP, au rolul de a relaxa macromolecula ADN ca și TopA, în timp ce în prezența ATP induc suprarăsuciri negative în moleculele circular covalent închise (CCC) relaxate. Cea mai cunoscută enzimă din această clasă este ADN giraza, care poate introduce aproximativ 100 de suprarăsuciri negative per minut.

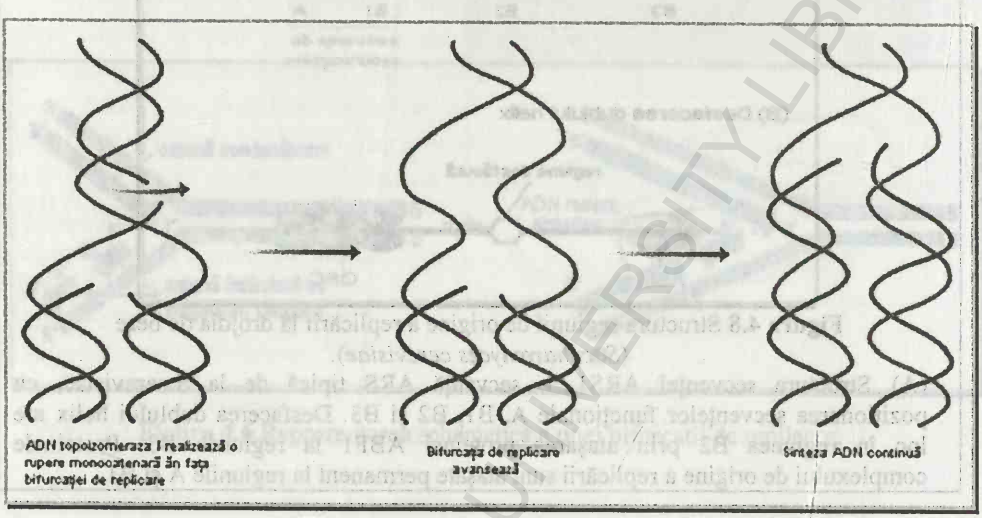


Figura 4.9 Desfacerea dublului helix într-o bifurcație de replicare, prin acțiunea topoizomerazelor.

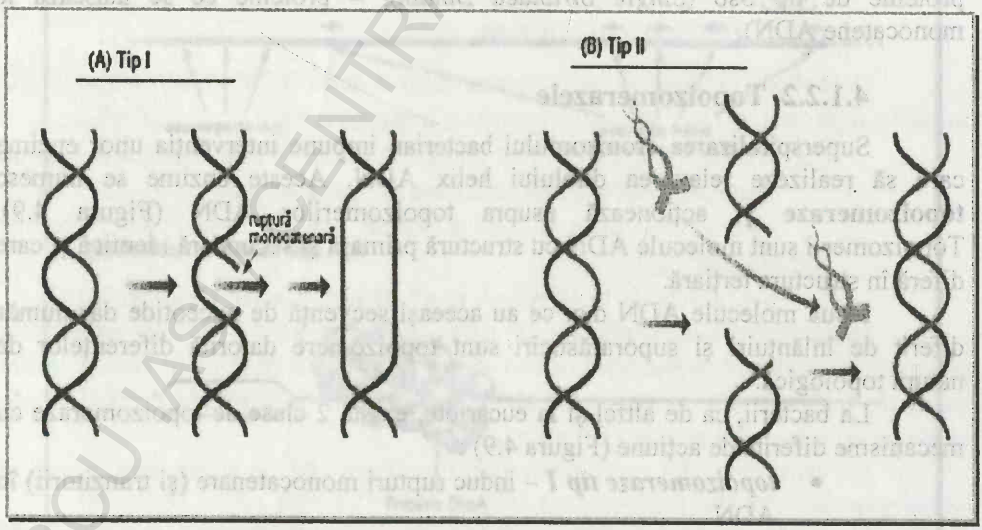


Figura 4.10 Modul de acțiune al ADN topoizomerazelor de tip I și II.
(A) Topoizomerazele de tip I realizează ruperi monocatenare, conduc catena intactă prin această rupere, refăcând apoi legătura fosfo-diesterică. (B) Topoizomerazele de tip II taie ambele catene dintr-un dublu helix; prin acest spațiu este trecut un alt fragment al dublului helix, iar apoi se refac cele 2 legături fosfo-diesterice.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

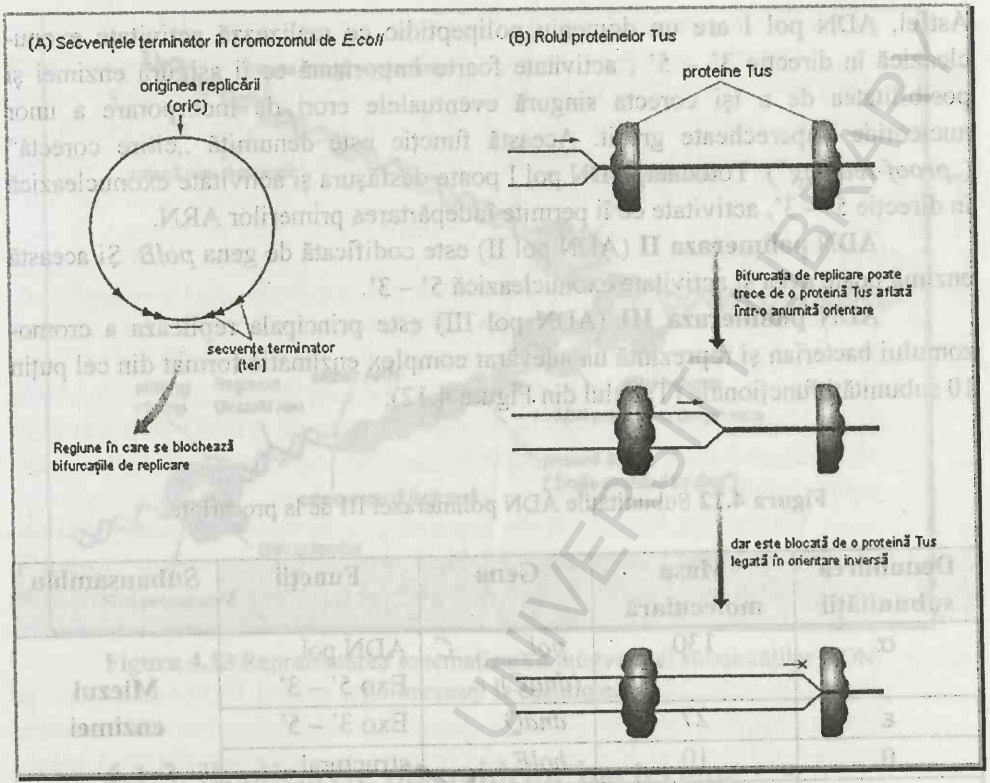


Figura 4.11 Rolul secvențelor terminator și al proteinelor Tus în replicarea cromozomului la *E.coli*.

4.1.2.3. ADN polimeraze

Procesul de replicare propriu-zisă a ADN este realizat de un complex de enzime denumite **ADN polimeraze**. Cea mai importantă activitate enzimatică desfășurată de o asemenea enzimă este formarea de legături fosfo-diesterice între nucleotide adiacente, cu creșterea lanțului în direcție 5' – 3'.

Toate ADN polimerazele descrise până în prezent polimerizează în direcție 5' – 3' și nu pot realiza acest proces decât pornind de la capul 3'OH liber al unei nucleotide. De obicei, acest cap este oferit de un scurt fragment monocatenar de ARN denumit ***primer***.

La bacterii au fost descrise 3 tipuri de ADN polimeraze ce coexistă în aceeași celulă:

ADN polimeraza I (ADN pol I) este codificată de gena *polA* și are o g.m. de aprox 100 Md. În celula de *E.coli* există circa 400 molecule de ADN pol I care are o viteză de polimerizare de 667 nucleotide / min. În afară de activitatea de polimerizare, această enzimă poate desfășura și activitate de exonucleză (adică de desfacere de legături fosfo-diesterice și eliminare de nucleotide dintr-o catenă).

Astfel, ADN pol I are un domeniu polipeptidic ce realizează activitate exonucleazică în direcție 3' – 5' , activitate foarte importantă ce îi asigură enzimei și posibilitatea de a își corecta singură eventualele erori de încorporare a unor nucleotide împerecheate greșit. Această funcție este denumită „citire corectă" („*proof-reading*"). Totodată, ADN pol I poate desfășura și activitate exonucleazică în direcție 5' – 3', activitate ce îi permite îndepărtarea primerilor ARN.

ADN polimeraza II (ADN pol II) este codificată de gena *polB*. Și această enzimă poate avea și activitate exonucleazică 5' – 3'.

ADN polimeraza III (ADN pol III) este principala replicaza a cromozomului bacterian și reprezintă un adevărat complex enzimatic format din cel puțin 10 subunități funcționale (Tabelul din Figura 4.12).

Figura 4.12 Subunitățile ADN polimerazei III de la procariote.

Denumirea subunității	Masa moleculară	Gena	Funcții	Subansamblu
α	130	*pol C (dnaC)*	ADN pol / Exo 5' – 3'	**Miezul enzimei**
ε	27	*dnaQ*	Exo 3' – 5'	
θ	10	*holE*	structural	
τ	71	*dnaXZ*	Dimerizarea miezului enzimei	**complexul τ**
γ	47	*dnaXZ*	ATPaze	**complexul γ** favorizează transferul sub.β la matrița ADN
δ	35	*holA*		
δ'	33	*holB*		
χ	15	*holC*		
φ	12	*holD*		
β	40	*dnaN*	Leagă miezul enzimei la ADN și îl reciclează	**complexul β**

Holoenzima ADN pol III acționează ca dimer, fiecare din cei 2 monomeri realizând sinteza pe una din cele 2 catene. O excepție o reprezintă complexul γ care acționează doar pe catena întârziată.

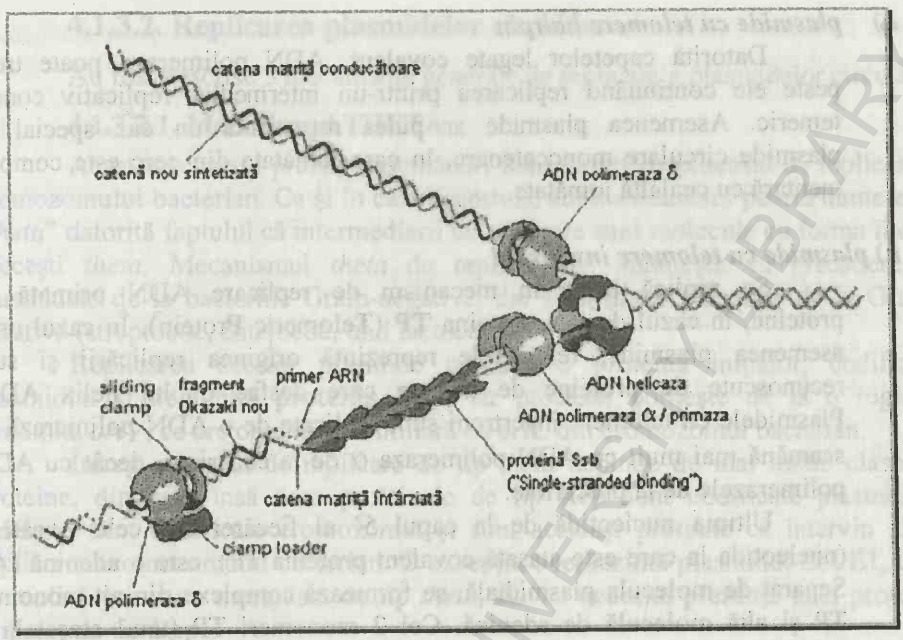


Figura 4.13 Reprezentarea schematizată a intervenției subunităților ADN polimerazei la eucariote.

4.1.3. Replicarea plasmidelor bacteriene

Indiferent dacă conferă bacteriei gazdă caractere esențiale sau neesențiale, toate plasmidele au în structura lor o regiune foarte importantă pentru replicarea și menținerea stabilă a plasmidului respectiv în populația bacteriană. În prezent se consideră că această regiune esențială ar conține:

a) secvențe de origine a replicării plasmidiale, denumite convențional ***oriV*** (fata de ***oriC*** - originea replicării cromozomului bacterian); o secvență *oriV* trebuie să indeplinească urmatoarele condiții:

- regiunea ADN minimală, cu activitate *în cis*, ce poate sustine replicarea plasmidială
- regiunea ADN în care cele 2 catene se despart pentru a inița procesul de replicare
- nucleotidul/nucleotidele la care incepe sinteza catenei *leading*

b) multe plasmide codifică o proteină implicată în inițierea replicării plasmidiale, denumita proteina de tip **Rep**

c) gene implicate în controlul replicării plasmidiale

4.1.3.1. Replicarea plasmidelor lineare (ADN d.c. linear)

În ceea ce privește replicarea plasmidelor lineare, aceasta se desfășoară prin mecanisme diferite funcție de tipul de telomere.

a) plasmide cu telomere hairpin

Datorită capetelor legate covalent, ADN polimeraza poate trece peste ele continuând replicarea printr-un intermediar replicativ concatemeric. Asemenea plasmide ar putea reprezenta un caz special de plasmide circulare monocatenare, în care jumătate din cerc este complementară cu cealaltă jumătate.

b) plasmide cu telomere invertroni

Se replică printr-un mecanism de replicare ADN primată de proteine, în cazul de față proteina **TP** (**T**elomeric **P**rotein). În cazul unor asemenea plasmide, telomerele reprezintă originea replicării şi sunt recunoscute de proteine de inițiere care desfac dublul helix ADN. Plasmidele cu telomere invertroni sunt replicate de o ADN polimerază ce seamănă mai mult cu ADN polimeraza α de la eucariote, decât cu ADN polimerazele de la procariote.

Ultima nucleotidă de la capul 5' al fiecărei din cele 2 catene (nucleotida la care este ataşată covalent proteina TP), este o adenină (A). Separat de molecula plasmidială, se formează complexe din alt monomer TP şi altă moleculă de adenină. Cei 2 monomeri TP (unul ataşat la o adenină, iar celălalt ataşat la adenina din telomera plasmidială) se atrag şi are loc procesul de dimerizare, iar între A şi primul nucleotid (T) de pe catena complementară se formează legături de hidrogen. Totodată, acest al doilea A oferă capul 3' liber pentru primarea polimerizarii (Figura 4.14).

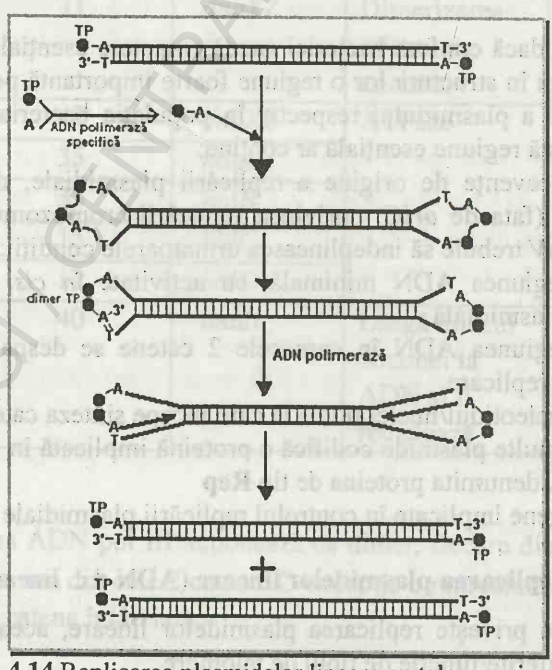


Figura 4.14 Replicarea plasmidelor lineare cu telomere invertroni.

4.1.3.2. Replicarea plasmidelor circulare.

Au fost descrise 3 mecanisme generale de replicare a plasmidelor circulare.

4.1.3.2.1. Mecanismul THETA

Acest mecanism prezintă asemănări foarte mari cu procesul de replicare a cromozomului bacterian. Ca şi în cazul acestuia, acest mecanism poartă numele de "*theta*" datorită faptului că intermediarii de replicare sunt molecule cu forma literei greceşti *theta*. Mecanismul *theta* de replicare se întâlneşte cu precădere la plasmidele de la bacteriile Gram-negative, dar şi la unele plasmide de la Gram-pozitive (streptococ, enterococ, unii lactococi).

Replicarea acestor plasmide necesită o proteină iniţiator, codificată plasmidial şi denumită **proteina Rep**, iar procesul porneşte de la o regiune denumita ***oriV***, ce are organizare similară cu ***oriC*** din cromozomul bacterian.

Întreg procesul de replicare de tip *theta* depinde de mai multe clase de proteine, din care însă doar proteinele de tip **Rep** sunt codificate plasmidial, celelalte sunt codificate cromozomal şi sunt aceleaşi proteine ce intervin şi în replicarea cromozomului bacterian. O excepţie o reprezintă plasmidul Col E1, care se replică printr-un mecanism de tip *theta*, dar nu necesită prezenţa unei proteine iniţiator de tip **Rep**.

La plasmidele ce se replică prin mecanism *theta*, regiunea ***oriV*** cuprinde: 4-5 secvenţe ADN în repetiţie directă şi denumite ***iteroni***, la care se ataşează proteina Rep (iteronii există şi în cazul celorlalte două mecanisme de replicare plasmidială), o regiune bogată în A/T, unde este iniţiată desfacerea dublului helix, cutii ***dnaA***, la care se ataşează proteina **DnaA**.

Proteinele Rep sunt proteine de tip *leucine-zipper* cu un domeniu HTH (*"α-helix-turn-α–helix"*) şi se ataşează la ADN intr-o manieră situs-specifică, şi anume la secvenţele *iteroni*. Ataşarea se realizează astfel încât moleculele Rep sunt aliniate pe aceeaşi faţă a moleculei ADN.

Etape

Procesul de replicare a plasmidelor prin mecanism *theta* se desfăşoară în urmatoarele etape:

a) în prima etapă are loc ataşarea proteinelor Rep la secvenţele iteroni; acest lucru determină o curbare a moleculei ADN în această zonă, fapt ce facilitează etapa următoare;

b) ataşarea proteinelor DnaA la cutiile *dnaA*; la rândul ei, această etapă o facilitează pe următoarea;

c) ataşarea complexului proteic **DnaB-DnaC** la regiunea din ***oriV*** bogată în A/T; **DnaB** este o helicază şi desface dublul helix în această zonă;

d) are loc sinteza unui ARN primer de către o ARN polimerază codificată de o genă cromozomală;

e) începe procesul de polimerizare desfăşurat, la majoritatea plasmidelor din această clasă, de către ADN polimeraza III (excepţie face plasmidul Col E1, care este replicat prin mecanism *theta*, dar de către ADN polimeraza I);

f) sinteza celor 2 catene (*leading* şi *lagging*) este cuplată şi se desfăşoară cvasi-simultan;

g) sinteza se desfăşoară în majoritatatea cazurilor unidirecţional, spre deosebire de replicarea cromozomului bacterian care la marea majoritate a speciilor bacteriene se desfăşoară bidirecţional.

Dintre cele mai cunoscute plasmide ce se replică prin mecanism *theta*, amintim pSC101, P1, RK2, RP4, R6K, R1, CColE2, ColE3.

4.1.3.2.2. Mecanismul STRAND-DISPLACEMENT (SD)

Denumirea provine din termenul *strand-displacement* (dislocarea catenei) şi se referă la faptul că în timpul procesului de replicare are loc dislocarea uneia din cele 2 catene ADN. Acest mecanism se întâlneşte mai ales la plasmidele promiscue din grupul de incompatibilitate **IncQ**. La aceste plasmide regiunea ***oriV*** este alcatuită din 3 secvenţe ADN de tip iteroni, 1 regiune bogată în G/C (174 bp), 1 regiune bogată în A/T (31 bp)

Procesul de replicare ADN de tip *strand-displacement* nu depinde de proteine ale celulei "gazdă" (codificate cromozomal, cum ar fi DnaA, DnaB, DnaC), ci de trei proteine codificate plasmidial:

RepA – este o helicază ce intra în dublul helix ADN în regiunea bogată în A/T şi faciliteaza dislocarea catenei parentale nereplicate sub forma *buclei D* (forma literei D);

RepB – este o primază care sintetizează un primer ARN necesar iniţierii polimerizării ADN;

RepC – este o proteină iniţiator care se ataşează la secvenţele iteroni din ***oriV***.

Replicarea porneşte de la două origini (***ssiA*** şi ***ssiB***) simetrice şi adiacente, ce funcţionează în forma monocatenară şi sunt situate pe cele 2 catene. Procesul de replicare începe când aceste 2 origini sunt expuse monocatenar.

Etape

Procesul de replicare SD se desfăşoară în următoarele etape:

1. monomeri ai proteinei *RepC* se ataşează la secvenţe iteroni din ***oriV***;
2. proteina *RepA* (helicaza) se ataşează la regiunea din ***oriV*** bogată în A/T, determinând desfacerea dublului helix;
3. proteina *RepB* (primaza) se ataşează la bucla A/T şi sintetizează un primer ARN;
4. începe procesul de polimerizare ADN;
5. helicaza *RepA* facilitează dislocarea catenei parentale nereplicate sub forma unei bucle D.

Produsele intermediare ale unui proces de replicare SD sunt:

- o moleculă ADN circulară d.c.
- o moleculă ADN circulară m.c. – pe aceasta va fi iniţiat un nou proces de replicare care va conduce la formarea catenei complementare, şi deci, a formei dublucatenare a plasmidului.

În cazul unui asemenea mecanism de replicare sinteza celor două catene noi ale moleculei de ADN nu este cuplată şi simultană.

4.1.3.2.3. Mecanismul ROLLING-CIRCLE (RC)

Denumirea provine din faptul că în timpul procesului, molecula de ADN are forma unui cerc rotativ. Acest mecanism de replicare este întâlnit la plasmide din multe bacterii Gram-pozitive, de exemplu plasmidul pT181 (de la *Staphylococcus*), pUB110 şi pC194 (de la *Bacillus subtilis*).

Ca şi în cazul mecanismului SD, replicarea de tip RC depinde de o proteină iniţiator codificată plasmidial (propteina Rep) şi de o serie de proteine codificate pe cromozomul bacterian.

Plasmidele ce se replică prin mecanism RC au doua secvenţe ***ori*** situate distanţat una de alta:

dso (*"double-stranded origin"*), de la care este iniţiată replicarea primei catene noi (catena *leading*); dso are 2 regiuni: regiunea *"bind"*, la care are loc ataşarea proteinei iniţiator **Rep** şi regiunea *"nick"*, în care proteina Rep produce ruptura monocatenară initială

sso (*"single-stranded origin"*), de la care este iniţiată sinteza celei de-a doua catene noi (catena *lagging*)

Etape

În procesul de replicare RC se parcurg următoarele etape:

- proteina Rep se ataşează la regiunea *"bind"* a secvenţei *dso*;
- proteina Rep taie o legătură fosfodiesterică (ruptură monocatenară) şi rămâne ataşată la capul 5' Tyr-fosfodiesterică; capul 3' va servi ca primer pentru sinteza catenei *leading*;
- în procesul de sinteză a catenei *leading* intervin o serie de proteine codificate pe cromozomul bacterian: helicaza, **Ssb**, ADN polimeraza III;
- replicarea catenei *leading* continuă mai mult de o rundă completă depăşind regiunea *dso*;
- pentru terminarea replicării catenei *leading* are loc o reacţie de transfer de catenă: prin monomerul liber, proteina Rep atacă regiunea *dso* a catenei vechi, taie o legatură fosfodiesterică şi reface alta, rezultând o moleculă circulară d.c. care a eliberat şi un dimer de Rep inactiv şi, respectiv, o moleculă circulară m.c. pe care, de la *sso*, este sintetizat un primer şi apoi o catenă noua

Deci, şi în cazul acestui mecanism sinteza celor două catene ADN noi nu este cuplată.

Într-un asemenea proces proteina Rep are un rol mai complex decât într-o replicare SD :

- se ataşează la *dso*, având rol în iniţierea replicării;
- taie o legătură fosfodiesterica, producând *nick*-ul iniţial;
- la terminarea sintezei primei catene noi, Rep taie şi reface legături fosfodiesterice

Datorită activităţii sale catalitice, proteina Rep de la plasmidele ce se replică printr-un mecanism RC este similară cu topoizomerazele din clasa I.

În general, plasmidele ce se replică prin RC au o alcătuire modulară, cel mai important modul fiind **LIC** (*"Leading strand Initiation and Control region"*) care este format din ***dso***, gena ***rep*** şi elemente de control al replicării plasmidei. Pe baza structurii ***LIC*** au fost definite 4 familii de plasmide ce se replică prin mecanism RC, familii ce au drept reprezentanţi urmatoarele plasmide: pT181, pC194, pMV158, pSN2. Alte module importante în aceste plasmide sunt: 1-2 *sso*, 1 *mob*, 1 genă de antibiorezistenţă.

4.1.3.3. Mecanisme de control al replicării ADN plasmidial

Replicarea acestor plasmide se desfăşoară unidirecţional şi este realizată de ADN polimeraza I şi nu de ADN pol III care replică cromosomul bacterian.

Plasmidele din familia Col E1

Procesul de replicare începe cu sinteza unui ARN primer (=ARN II), ce este transcris începând de la un situs localizat la 555 pb în amonte faţă de ***oriV***. Iniţial, acest transcript este separat de ADN, ca în cazul unei transcrieri obişnuite. Pe măsură ce ARN polimeraza se apropie de ***oriV***, transcriptul începe să ramână hibridizat cu matriţa ADN; cauza probabilă: ARN II conţine 6 G consecutive situate la circa 265 nucleotide în amonte faţă de oriV; aceste 6 G interacţionează probabil cu 6 C consecutive din ADN matriţă, ce se găsesc la cca 20 nucleotide în amonte faţă de oriV. Apoi hibridul este tăiat de RNaza H, iar capul 3′ al ARN va fi elongat de ADN pol I.

O modalitate de control negativ al replicării plasmidelor din familia Col E1 este prin formarea unui al doilea ARN (=ARN I), care are funcţie de ARN antisens, contine 108 nucleotide şi este transcris de la -445 faţă de oriV, dar în direcţie opusă, de pe cealaltă catenă ADN.

Prin legarea lui ARN I (antisens) de ARN II (primer) este alterată conformaţia secundară a acestuia din urmă, astfel încât ARN primer nu mai poate hibridiza cu oriV.

Acest ARN antisens este transcris constitutiv, dar este instabil, iar legarea lui la ARN II este mediată de o proteină numită **Rop** (codificată de gena ***rop***).

Aplicarea unui inhibitor al sintezei proteice (de exemplu, cloramfenicolul) blochează sinteza proteinei Rop, rezultatul fiind o creştere a frecvenţei de iniţiere a replicării plasmidelor Col E1. Acest lucru se bazează pe faptul că în citoplasma bacteriană există suficiente molecule de ADN pol I (cca 300), chiar dacă este blocată proteosinteza.

pSC101

Prima citare a lui pSC101 în literatura de specialitate a fost în 1973 - Cohen care a folosit-o ca vector în experimente de clonare. Ulterior însă, această plasmidă a fost identificată ca plasmidă naturală la *Salmonella* şi *Escherichia coli*. Ea prezintă un număr mediu de copii (6-7) per echivalent cromosomal şi are o genă de rezistenţă la tetraciclină. Întreaga plasmida (9263 pb) a fost complet secvenţiată.

Regiunea replicativă a acestei plasmide are 3 zone majore:

(1) regiunea ***par*** - foarte importantă pentru stabilitate şi afectează şi numărul de copii;

(2) regiunea ***ori*** - de la care porneşte replicarea unidirecţională şi care conţine majoritatea situsurilor necesare pentru replicare şi pentru incompatibilitate;

(3) gena ***repA*** - care este o genă specific plasmidială şi codifică o proteină de replicare.

pSC101, împreună cu fagul P1 şi cu o serie de alte plasmide (F, R6K), aparţine unei clase de repliconi a caror replicare nu este realizată de ADN polimeraza I. Aceşti repliconi codifică o proteină autoreglată (**RepA**) esenţială pentru replicare şi poseda copii repetate direct ale unei secvenţe ce este specifică pentru fiecare plasmidă şi la care se ataşeaza proteina RepA. RepA se ataşează la cele 3 secvenţe RS din regiunea *ori* , participând la iniţierea replicării.

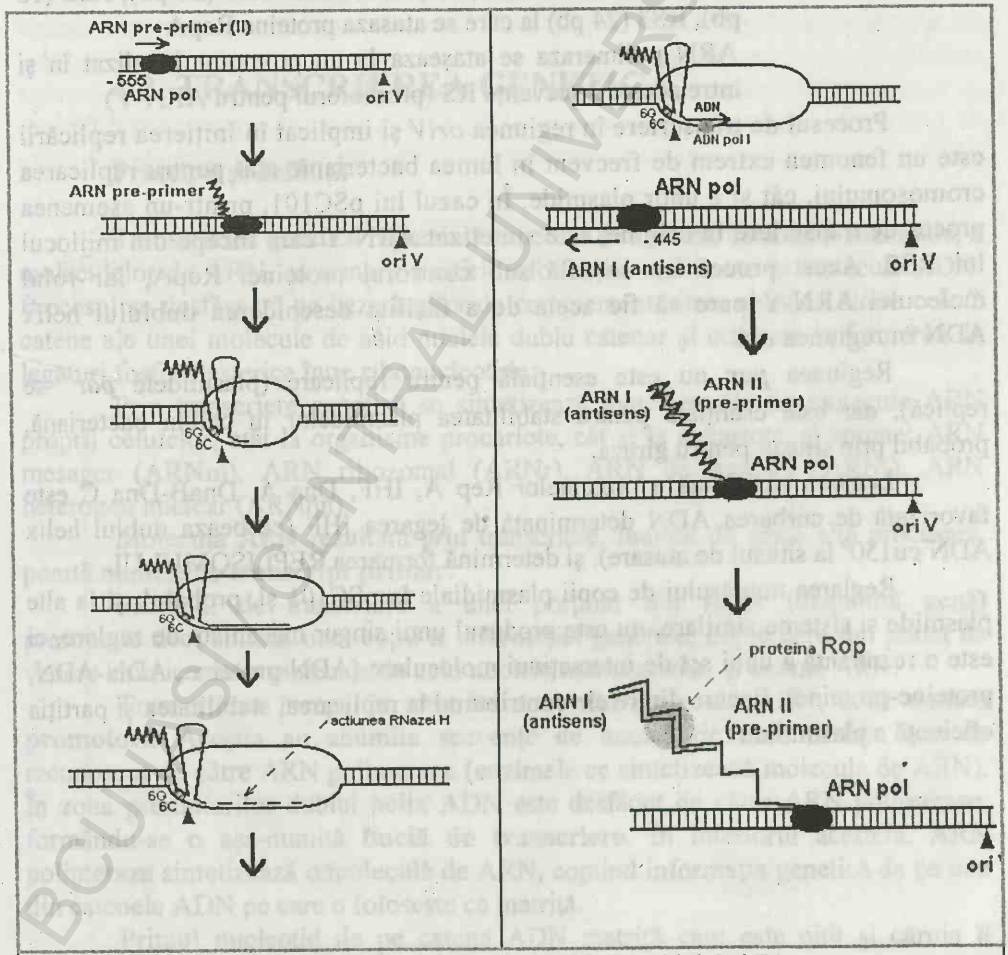


Figura 4.15 Controlul replicării la plasmidul Col E1.

BCU "I. CENTRAL UNIVERSITARĂ LIBRARY

Menținerea stabilă a lui pSC101 în celula bacteriană presupune intervenția a mai multor clase de proteine: **DnaA** (esențială și în inițierea replicării cromosomului bacterian), **IHF** (Integration Host Factor, proteină *histone-like* implicată în reglarea unei serii de procese celulare), **DnaB**, **DnaC**, **DnaG** (primaza), componente ale holoenzimei **ADN polimeraza III**.

Regiunea ***ori*** din plasmidul pSC101 conține situsuri multiple de legare pentru proteine esențiale în replicarea plasmidială:

- un situs de atașare a proteinei DnaA
- 2 secvențe repetate, formate din câte 13 pb (13-mer), omo-loage cu secvențele din oriC și la care se atașează complexul DnaB-DnaC
- o regiune bogată în A/T
- între regiunea A și regiunea T se găsește situsul pentru IHF
- un cluster de 3 secvențe repetate direct RS1 (24 pb), RS2 (18 pb), RS3 (24 pb) la care se atasaza proteina RepA
- ARN polimeraza se atașeaza la un promotor localizat în și între aceste 3 secvențe RS (promotorul pentru ARN-Y)

Procesul de transcriere în regiunea *oriV* și implicat în inițierea replicării este un fenomen extrem de frecvent în lumea bacteriană, atât pentru replicarea cromosomului, cât și a unor plasmide. În cazul lui pSC101, printr-un asemenea proces de transcriere la origine, este sintetizat ARN-Y care începe din mijlocul lui RS2. Acest proces nu se află sub controlul proteinei RepA, iar rolul moleculei ARN-Y pare să fie acela de a facilita deschiderea dublului helix ADN în regiunea *ori*.

Regiunea ***par*** nu este esențială pentru replicare (plasmidele ***par***$^-$ se replică), dar este esențială pentru stabilitatea plasmidelor în celula bacteriană, probabil prin situsul pentru giraza.

Legarea simultană a proteinelor Rep A, IHF, Dna A, DnaB-Dna C este favorizată de curbarea ADN determinată de legarea IHF (curbeaza dublul helix ADN cu150° la situsul de atasare), și determină formarea REPLISOMULUI.

Reglarea numărului de copii plasmidiale la pSC101 și, probabil, și la alte plasmide și sisteme similare, nu este produsul unui singur mecanism de reglare, ci este o rezultantă a unui set de interacțiuni moleculare (ADN-proteine, ADN-ADN, proteine-proteine), fiecare dintre ele contribuind la replicarea, stabilitatea și partiția eficientă a plasmidului.

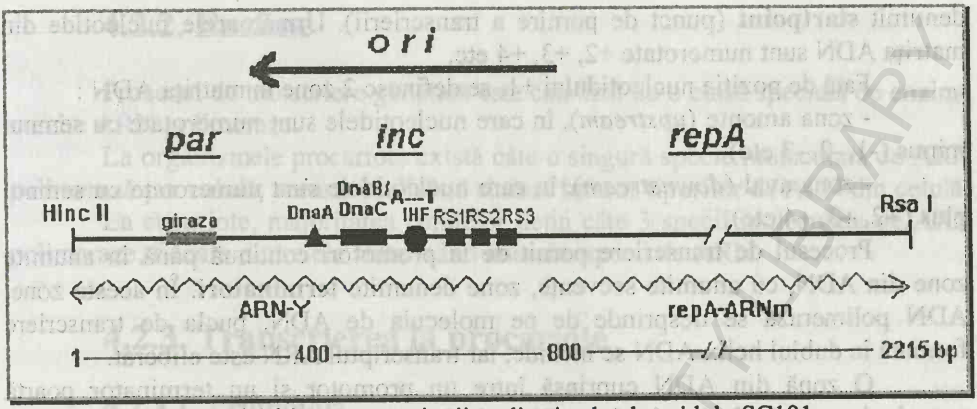


Figura 4.16 Structura regiunii replicative la plasmidul pSC101.

4.2. TRANSCRIEREA GENETICĂ

Principii şi definiţii

Transcrierea genetică reprezintă procesul de sinteză, catalizată enzimatic, a moleculelor de ARN, ca urmare a citirii informaţiei codificate în molecule ADN. Procesul se desfăşoară pe baza legilor de complementaritate chimică dintre cele 2 catene ale unei molecule de acid nucleic dublu catenar şi conduce la formarea de legături fosfo-diesterice între ribonucleotide.

Prin transcriere genetică se sintetizează toate tipurile de molecule ARN proprii celulelor, atât la organisme procariote, cât şi la eucariote, şi anume: ARN mesager (ARNm), ARN ribozomal (ARNr), ARN de transfer (ARNt), ARN heterogen nuclear (ARNhn).

Molecula ARN rezultată prin transcriere, înainte de orice altă procesare, poartă numele de **transcript primar**.

Procesul de transcriere a unei porţiuni din ADN (denumită genă) presupune deci sinteza unei copii a informaţiei genetice, copie care din punct de vedere chimic este o molecula de acid nucleic monocatenar, şi anume ARN.

Transcrierea începe în anumite zone din molecula ADN, zone numite **promotori**. Aceştia au anumite secvenţe de nucleotide care îi fac uşor de recunoscut de către ARN polimeraze (enzimele ce sintetizează molecule de ARN). În zona promotorilor dublul helix ADN este desfăcut de către ARN polimeraze, formându-se o aşa-numită **buclă de transcriere**. În interiorul acesteia, ARN polimeraza sintetizează o moleculă de ARN, copiind informaţia genetică de pe una din catenele ADN pe care o foloseşte ca matriţă.

Primul nucleotid de pe catena ADN matriţă care este citit şi căruia îi corespunde un prim nucleotid în catena ARN, este numerotat convenţional cu +1 şi

denumit **startpoint** (punct de pornire a transcrierii). Următoarele nucleotide din matrița ADN sunt numerotate +2, +3, +4 etc.

Față de poziția nucleotidului +1, se definesc 2 zone în matrița ADN :

- zona amonte (*upstream*), în care nucleotidele sunt numerotate cu semnul minus (-1, -2, -3 etc)
- zona aval (*downstream*), în care nucleotidele sunt numerotate cu semnul plus (+2, +3, +4 etc)

Procesul de transcriere pornit de la promotori continuă până în anumite zone din ADN, cu anumite secvențe, zone denumite **terminatori**. În aceste zone, ADN polimeraza se desprinde de pe molecula de ADN, bucla de transcriere formată în dublul helix ADN se închide, iar transcriptul ARN este eliberat.

O zonă din ADN cuprinsă între un promotor și un terminator poartă numele de **unitate de transcriere**. Din cele 2 catene ale moleculei de ADN, catena care este folosită ca matriță pentru sinteza unui transcript ARN este complementară cu aceasta și este numită **catenă antisens**. Catena ne-matriță este denumită catenă codificatoare sau **catenă sens**.

Admițând că o genă reprezintă o zonă din ADN (sau mai exact, secvența de nucleotide de pe una din catenele ADN dintr-o anumită zonă) ce codifică un polipeptid (sau o moleculă de ARNr, ARNt ARNhn), o unitate de transcriere poate include :

- o singură genă, caz în care se numește **transcriere monocistronică**
- sau mai multe gene, caz în care se numește **transcriere policistronică**

Deși există și destule excepții, în general, transcrierea monocistronică este caracteristică organismelor eucariote, iar cea policistronică – procariotelor (Figura 4.16)

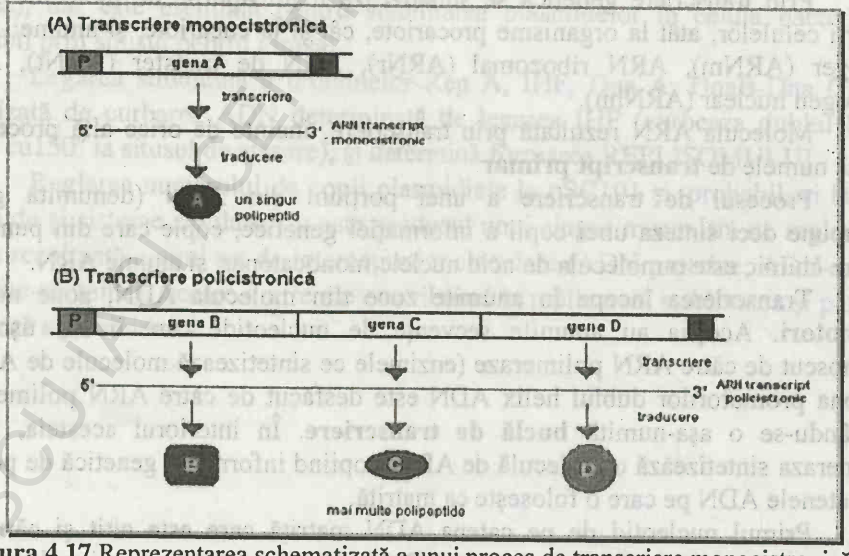


Figura 4.17 Reprezentarea schematizată a unui proces de transcriere monocistronică și, respectiv, policistronică.

4.2.2. Enzime

Procesul de transcriere genetică este catalizat de o clasă specială de enzime numite ARN polimeraze.

La organismele procariote există câte o singură specie moleculară de ARN polimerază per celulă, aceasta realizând sinteza tuturor tipurilor de ARN din celulă.

La eucariote, majoritatea celulelor deţin câte 3 specii moleculare de ARN polimeraze, fiecare dintre ele sintetizând anumite specii de ARN.

4.2.3. Transcrierea la procariote

4.2.3.1. Promotori

Promotorii reprezintă secvenţe din structura ADN, aflate în amonte faţă de ogenă, la care se ataşează în mod situs-specific (în funcţie de secvenţa de nucleotide) ARN polimeraza.

Un promotor de la procariote prezintă 4 regiuni importante din punct de vedere funcţional :

- o secvenţă hexamerică (adică formată din 6 perechi de baze) în jurul poziţiei -35; este denumit generic *hexamerul -35*
- o secvenţă hexamerică în jurul poziţiei -10, denumită generic *hexamerul -10*
- o regiune spaţiatoare între cei 2 hexameri (*ADN spacer*)
- o regiune situată între poziţiile -40 şi -60, bogată în A şi T, denumită elementul UP (*Upstream* = amonte)

Cei 2 hexameri şi elementul UP au secvenţă de nucleotide înalt conservată, secvenţele consensus fiind 5'-TTGACA-3' pentru hexamerul -35 şi, respectiv, 5'-TATAAT-3' pentru hexamerul -10 (Figura 4.18).

Cu cât secvenţele de nucleotide din cei 2 hexameri sunt mai apropiate de cele de mai sus, cu atât tăria promotorului respectiv este mai mare, adică cu atât ARN polimeraza se va ataşa mai strâns şi cu atât gena respectivă va fi transcrisă cu o rată mai ridicată.

Cei 2 hexameri din promotori sunt recunoscuţi de subunitatea σ α ARN polimerazei, iar la elementul UP se ataşează subunitatea α-CTD a acestei enzime.

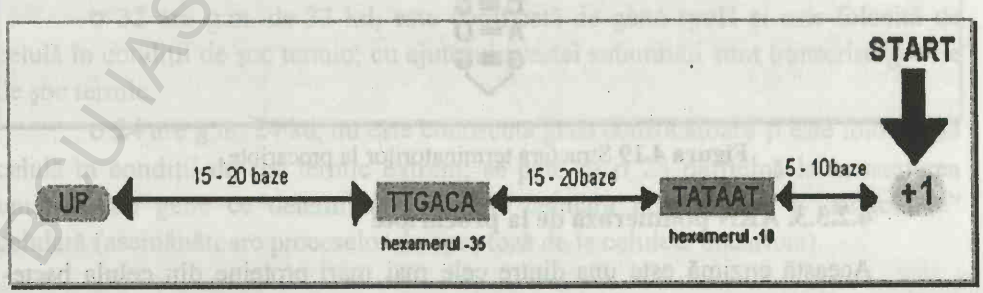


Figura 4.18 Structura promotorilor la procariote.

4.2.3.2. Terminatori

Transcrierea genetică continuă de la promotori până la terminatori. Aceştia reprezintă regiuni din molecula ADN ce prezintă o anumită secvenţă de nucleotide:

- 2 copii ale unei secvenţe poli-GC în repetiţie inversă; această regiune prezintă complementaritate intracatenară şi determină formarea în transcriptul ARN a unei structuri în ac-de-păr (hairpin) ce împiedică avansarea ARN polimerazei

- o regiune formată din 4 – 10 adenine (ce corespunde pe transcript cu 4 – 10 resturi de uracil) care reprezintă semnalul propriu-zis de terminare a transcrierii

Deşi regiunile terminator sunt identificate pe molecula ADN, terminarea transcrierii este de fapt realizată de catena ARN (Figura 4.19).

Până în prezent au fost identificate 2 clase de terminatori la procariote:

- terminatori Rho – independenţi : sunt regiuni de tip terminator în care cele 2 secvenţe poli-GC prezintă complementaritate intracatenară perfectă, realizând o structură în ac-de-păr stabilă

- terminatori Rho – dependenţi : sunt regiuni terminator în care cele 2 poli-GC nu prezintă complementaritate intracatenară perfectă; în acest caz structura în ac-de-păr este stabilizată de către o proteină numită proteina Rho (de la litera grecească Rho - ρ) care alunecă pe molecula ARN până la acul-de-păr şi îl stabilizează.

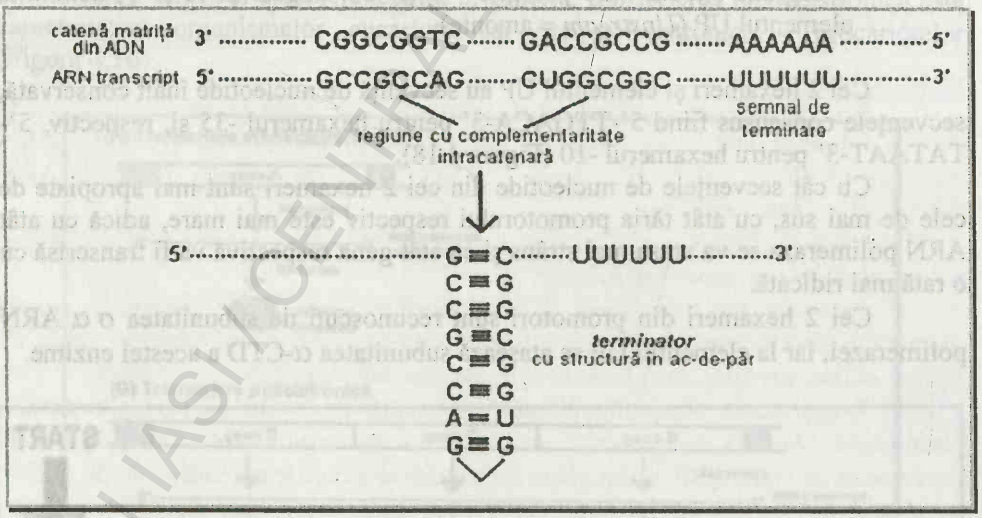


Figura 4.19 Structura terminatorilor la procariote.

4.2.3.3. ARN polimeraza de la procariote

Această enzimă este una dintre cele mai mari proteine din celula bacteriană, având o greutatea de 480 kd, un diametru de aproximativ 100 Angstromi şi

fiind vizibilă şi la microscopul electronic. O celulă de *E.coli* conţine în medie 7000 de molecule de ARN polimerază.

Holoenzima este formată din 4 tipuri de subunităţi: α, b, b' şi σ. Subunitatea α este dimerizată, formul generală a enzimei fiind 2a – β – β' – σ.

Subunitatea α este codificată de gena *rpoA* şi este dimerizată. Ea are un prim rol în asamblarea tuturor subunităţilor enzimei, proces ce se desfăşoară în ordinea: α → 2α → 2α-β → 2α-β-β' → 2α-β-β'-σ. Fiecare monomer de α este format din 3 regiuni:

- α–CTD reprezintă domeniul carboxi-terminal al subunităţiiα şi se ataşează direct la ADN, recunoscând secvenţa UP din structura promotorilor.
- α–NTD reprezintă domeniul amino-terminal al subunităţii α; nu se ataşează direct la ADN, ci la subunitatea β
- linker polipeptidic ce are o structură flexibilă şi face legătura dintre cele 2 domenii terminale

Subunitatea β este codificată de gena *rpoB* şi realizează formarea propriu-zisă a legăturilor fosfo-diesterice între ribonucleotide, acest proces desfăşurându-se întotdeauna în direcţie 5' – 3'.

Subunitatea β' este codificată de gena *rpoC* şi are rol în ataşarea iniţială, situs-nespecifică a ARN polimerazei la molecula de ADN (Figura 4.20).

Subunitatea σ

Celula procariotă conţine mai multe specii moleculare de subunitate σ, fiecare recunoscând anumiţi promotori şi, deci, transcriind anumite gene. Astfel, în celula de *E.coli*, cele mai des întâlnite specii moleculare de σ sunt:

σ 70 are o g.m. de 70 kd şi codificată de gena rpoD; acest σ recunoaşte cele 2 secvenţe consensus TTGACA şi TATAAT, fiind folosit de celula bacteriană în condiţii generale de mediu. Ca urmare, marea majoritate a genelor bacteriene sunt transcrise cu ajutorul acestei subunităţi σ 70.

σ 60 are g.m. 60 kd, este codificată de gena rpoN şi este folosită de celulă în condiţii de privare de azot.

σ 32 are g.m. de 32 kd, este codificată de gena rpoH şi este folosită de celulă în condiţii de şoc termic; cu ajutorul acestei subunităţi sunt transcrise genele de şoc termic.

σ 24 are g.m. 24 kd, nu este cunoscută gena codificatoare şi este folosită de celulă în condiţii de şoc termic extrem; se pare că σ 24 participă la transcrierea unui set de gene ce determină o moarte celulară programată, o „sinucidere" celulară (asemănătoare proceselor de apoptoză de la celulele eucariote).

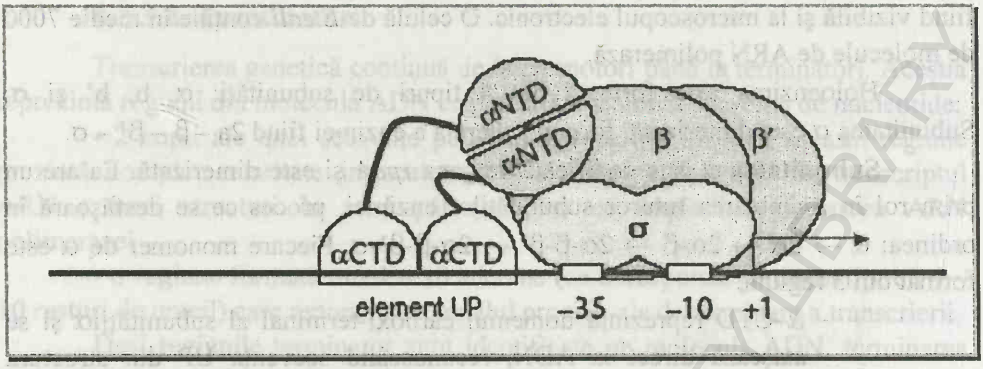


Figura 4.20 Reprezentarea schematică a ataşării ARN polimerazei procariote la promotori.

4.2.3.4. Fazele transcrierii genetice la procariote

Ca şi alte procese realizate de materialul genetic, transcrierea genetică se desfăşoară în 3 etape – iniţierea, elongarea şi terminarea transcrierii.

Iniţierea transcrierii

Această etapă începe prin ataşarea ARN polimerazei la un promotor, proces ce se desfăşoară el însuşi în mai multe etape:

a) etapa de *promotor închis I* – ARN polimeraza se ataşează la hexamerul -35

b) etapa de *promotor închis II* (promotor curbat) – ARN polimeraza se ataşează apoi şi la hexamerul -10; cei 2 hexameri nu sunt însă orientaţi steric optim faţă de situsurile de ataşare la ARN polimerază (şi anume lla subunitatea s); ca urmare, pentru a se ataşa la amândoi hexamerii, enzima trebuie să distorsioneze molecula de ADN; deci, promotorul curbat prezintă o tensiune torsională ce va fi eliberată prin deschiderea dublului helix pe o distanţă de 10 – 18 pb, ajungându-se astfel în cea de-a treia etapă, cea de

c) etapa de *promotor deschis*; se formează astfel bucla de transcriere care depăşeşte situsul START (nucleotidul +1 al catenei matriţă)

Se formează astfel un complex binar: ADN – ARN polimerază. Iniţierea transcrierii continuă cu ataşarea primului nucleotid, care de obicei la procariote este ATP sau GTP. Complexul devine astfel din binar, ternar: ADN – ARN polimerază – ARN. După sinteza a aproximativ 8-10 ribonucleotide, subunitatea σ se desprinde din complex, considerându-se că acest eveniment încheie etapa de iniţiere a transcrierii.

Elongarea transcrierii

Această etapă începe după desprinderea subunităţii σ şi este realizată de subunitatea β care formează legături fosfo-diesterice între ribonucleotide. Catena ARN creşte în direcţia 5' - 3'. O dată cu ARN polimeraza, şi bucla de transcriere se

deplasează pe molecula de ADN, transcriptul rămânând în hibrid cu matriţa ADN doar pe o porţiune de aproximativ 12 nucleotide.

Rata de polimerizare a ARN polimerazei de la *E.coli* este de circa 30 – 40 nucleotide per secundă. Frecvenţa erorilor de încorporare (a ribonucleotidelor greşit împerecheate cu cele din catena matriţă ADN) de către această enzimă este de 1 bază greşită per 10^4 baze încorporate. După ce ARN polimeraza a trecut de promotor, o altă enzimă (cu tot cu subunitate σ) se poate ataşa la acesta şi poate începe o nouă rundă de transcriere.

Terminarea transcrierii

Terminarea transcrierii are loc în momentul în care ARN polimeraza ajunge în regiunea unui terminator. Acul-de-păr format în catena transcriptului (vezi figura 4.18) blochează avansarea enzimei şi o determină să staţioneze câteva milisecunde; acest timp este însă suficient pentru ca transcriptul să se desprindă din hibridul cu catena ADN matriţă (desprinderea este facilitată şi de faptul că legăturile dintre poli-A de pe ADN şi poli-U din ARN sunt slabe). Bucla de transcriere se închide şi astfel procesul este încheiat.

Moleculele de ARN transcript pot evolua fie ca ARN measger, ARN ribozomal, ARN de transfer.

Majoritatea moleculelor de ARNm de la procariote sunt monocistronice şi sunt alătuie din 3 regiuni mai importante :

- regiunea **cap** (*leader*), care conţine secvenţa SHINE-DALGARNO (5'-AGGAGG3') ce este complementară cu un hexamer de la capul 3' al moleculelor de ARNr de 16S
- regiunea **codificatoare**, care începe cu codonul start AUG şi se termină cu un codon stop
- regiunea **cozii**

4.2.4. Transcrierea la eucariote

4.2.4.1. ARN polimerazele la eucariote

În sine, procesul de transcriere la organismele eucariote se desfăşoară în mod similar cu cel de la procariote. Există totuşi o serie de diferenţe.

Astfel, în timp ce la procariote există o singură specie moleculară de ARN polimerază per celulă, la eucariote există, în majoritatea cazurilor 3 specii moleculare de asemenea enzime. Cele 3 ARN polimeraze de la eucariote sunt înrudite şi structural şi funcţional. Cu toate acestea, cele 3 enzime iniţiază transcrierea de la promotori diferiţi şi transcriu gene diferite :

- **ARN polimeraza I** – transcrie în mod special gene ce codifică pentru ARN ribozomal
- **ARN polimeraza II** – transcrie mai ales gene ce codifică ARN mesager
- **ARN polimeraza III** – transcrie mai ales ARN de transfer şi o serie de molecule mici de ARN, de exemplu ARN nuclear mic şi nucleolar mic

Alte diferenţe importante apar şi în ceea ce priveşte factorii de transcriere. Astfel, dacă la procariote iniţierea transcrierii necesită doar facotrul σ, la eucariote debutul acestui proces necesită mai multe proteine, denumite generic factori de transcriere generali.

În general, structura promotorilor pentru ARN pol I şi III este mai simpla decât a promotorilor pentru ARN pol II, deşi şi aceste 2 enzime necesită factori de transcriere.

4.2.4.2. Promotorul la eucariote

Regiunile promotor la eucariote prezintă o zonă „miez" care cuprinde un set minimal de secvenţe necesare iniţierii transcrierii de către ARN pol II. Un asemenea „miez" de promotor este de obicei format din 40 de nucleotide ce cuprind de multe ori şi situsul START (nucleotidul +1) şi este format din:

- elementul BRE ce reprezintă elementul de recunoaştere a factorului de transcriere TFIIB (TFIIB Recognition Element)
- cutia TATA la care se ataşează factorul TBP (TATA Binding Protein); această proteină reprezintă de fapt o subunitate a factorului de transcriere TFIID
- regiunea Inr (Initiator) la care se ataşează factorul TFIID
- regiunea DPE (Downstream Promoter Element = elementul în aval faţă de promotor) la care se ataşează tot TFIID

Cei mai mulţi promotori de la eucariote includ doar 2 sau 3 din aceste regiuni (Figura 4.21).

4.2.4.3. Complexul de pre-iniţiere

Factorii de transcriere necesari ARN polimerazei II au fost notaţi TFII (*Transcription Factors for RNA polymerase II*).

La eucariote se formează mai întâi un complex preoteic de pre-iniţiere care se ataşează la elementul TATA. Succesiunea de evenimente este următoarea :

- elementul TATA este recunoscut de TFIID; această proteină este un complex cu mai multe subunităţi, dintre care una (TBP) se va lega la cutia TATA.
- celelalte subunităţi ale complexului TFIID poartă numele de proteine TAF (TBP Associated Factors = factori asociaţi cu TBP)
- TBP se leagă la cutia TATA; prin legarea sa la cutia TATA, TBP distorsionează molecula de ADN în acea regiune determinând „recrutarea" şi a altor factori de transcriere şi a ARN polimerazei
- TFIIA şi TFIIB se ataşează la promotor
- TFIIF se cuplează cu ARN polimeraza şi împreună se ataşează la promotor
- TFIIE şi TFIIH se ataşează şi ei la întreg acest complex nucleo-proteic

Ca urmare a ataşării acestor proteine, dublul helix se deschide în zona promotorului. Spre deosebire de procariote, la eucariote deschiderea dublului helix necesită energie (furnizată prin hidroliza ATP) iar procesul este mediat de activitatea de tip helicază a factorului TFIIH.

Sinteza catenei ARN poate acum să înceapă.

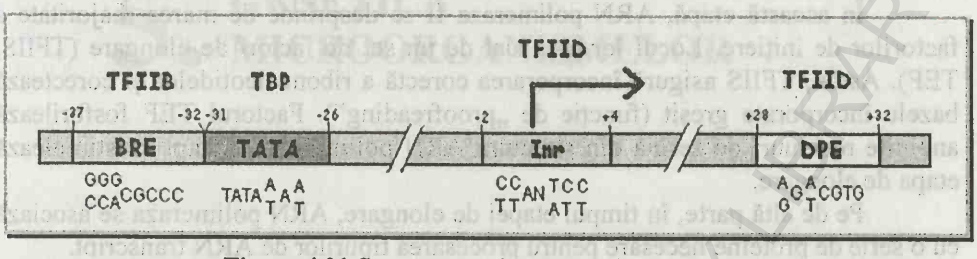


Figura 4.21 Structura unui promotor la eucariote.

Figura 4.22 Factorii generali de transcriere pentru ARN polimeraza II

Factori generali de transcriere	Numărul de subunităţi
TBP	1
TFIIA	2
TFIIB	1
TFIIE	2
TFIIF	3
TFIIH	9
proteine TAF	11

Caseta 4. ....Rolul celorlalte proteine GTF

Proteinele TAF se asociază cu factorul TBP, mediind ataşarea acestuia la cutia TATA. TFIIB se pare că mediază legătura dintre complexul TBP-TATA şi ARN polimerază. TFIIF modifică conformaţia sterică a ARN polimerazei facilitând ataşarea acesteia la promotor. TFIIE îl aduce pe TFIIH şi îi reglează activitatea. TFIIH desface legăturile de hidrogen dintre cele 2 catene ADN, cu formarea buclei de transcriere.

S-a constatat că *in vivo* iniţierea transcrierii la eucariote necesită şi alte proteine în afară de cele listate mai sus, inclusiv un aşa-numit complex mediator, a cărui funcţie rămâne deocamdată necunoscută.

4.2.4.4. Factorii de elongare

În această etapă, ARN polimeraza II se desprinde de marea majoritate a factorilor de inițiere. Locul lor este luat de un set de factori de elongare (TFIIS, TEF). Astfel, TFIIS asigură încorporarea corectă a ribonucleotidelor și corectează bazele încorporate greșit (funcție de „proofreading"). Factorul TEF fosforilează anumite reziduuri de serină din structura ARN polimerazei II, fapt ce stimulează etapa de elongare.

Pe de altă parte, în timpul etapei de elongare, ARN polimeraza se asociază cu o serie de proteine necesare pentru procesarea tipurilor de ARN transcript.

- enzime ce adaugă la capul 5' al transcriptului un rest de guanină metilată, ceea ce îi va conferi transcriptului rezistență la enzime de tip nucleaze și se atașează la structura ribozomului
- enzime ce produc poliadenilarea capătului 3': enzime de tip poli-A polimeraze adaugă o coadă de până la 200 de resturi de A la capul 3' al transcriptului; atașarea unei asemenea enzime pare să fie implicată în terminarea transcrierii

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. GENETICA MICROORGANISMELOR

5.1. GENOMUL BACTERIAN

Genomul bacterian este alcătuit din gene esențiale supraviețuirii, grupate la nivelul cromosomului și gene accesorii, prezente la nivelul plasmidelor sau a elementelor genetice transpozabile. Prezența sau absența plasmidelor sau a elementelor genetice transpozabile nu este esențială pentru existența bacteriilor în condiții normale dar poate reprezenta un avantaj, respectiv dezavantaj, în condiții modificate de mediu (de exemplu, prezența în mediu a unor antibiotice va permite supraviețuirea doar a celulelor bacteriene ce conțin plasmide de rezistență).

Așa cum s-a prezentat deja, **cromosomul bacterian** este alcătuit dintr-o macromoleculă de ADN, dublu catenară, de obicei circulară închisă covalent, care ocupă o anumită regiune din celula bacteriană. Regiunea respectivă are un aspect mai clar pe microelectronografii, comparativ cu restul citoplasmei (figura 5.1), fiind plină de fibrile ce dispar prin tratare cu DN-ază. Structura circulară este caracteristică și altor molecule de ADN prezente în celulă așa cum sunt plasmidele. Avantajele structurii circulare nu sunt pe deplin clarificate dar, se consideră că acest tip de structură asigură protejarea moleculei de ADN față de degradarea enzimatică prin exonucleaze (enzime care acționează asupra extremităților libere ale moleculelor, de obicei la sfârșitul replicării).

Figura 5.1. Aspect electronomicroscopic al nucleoidului unei celule bacteriene (*Streptomyces sp.*)(săgeata).

Cu toate acestea, nu la toate bacteriile cromosomul este circular. Astfel, la *Borrelia burgdorferi, Rhodococcus fasciens* sau *Streptomyces lividans* s-a dovedit că ADN cromosomal are o conformație lineară, dar semnificația acestui fenomen nu a fost pe deplin clarificată (Hinnenbursch și Tilly, 1993) (tabelul 5.1).

Dimensiunea cromosomului bacterian variază în funcție de specie, ea fiind de ordinul 10^6 nucleotide (Mb). (tabelul 5.1).

Fiecare celulă bacteriană posedă, de obicei, o singură moleculă de ADN cromosomal. Atunci când celulele bacteriene se divid, cromosomul suferă un proces de multiplicare astfel că, la un moment dat, fiecare celulă conține mai multe copii ale ADN cromosomal, chiar dacă ele nu sunt complete. Cu toate acestea, analize recente efectuate asupra unor bacterii cum ar fi *Rhodococcus sphaeroides* au evidențiat faptul că celulele bacteriene pot conține mai mulți cromosomi (2 sau 3) (Suwato și Kaplan, 1992).

Principalul criteriu care a stat la baza ideii că a doua moleculă de ADN de dimensiuni mari reprezintă un cromosom și nu o megaplasmidă este prezența de gene esențiale supraviețuirii în condiții normale (de exemplu, gene pentru ARNr sau pentru proteine ribosomale).

Tabelul 5.1

Mărimea genomului bacterian și tipul de cromosom

Microorganismul	Tipul de cromosom și dimensiune	Plasmide
Agrobacterium tumefaciens	Un cromosom linear (2,1 Mb) și un cromosom circular (3,0 Mb)	2 plasmide circulare (450 kb; 200 kb)
Bacillus subtilis	Un cromosom circular (4,2 Mb)	± plasmide (în funcție de tulpină)
B.thuringiensis	Un cromosom circular (5,7 Mb)	6 plasmide (>50 kb)
Borrelia sp.	Un cromosom linear (0,91 Mb)	Mai multe plasmide circulare sau lineare (5-200 kb)
Brucella melitensis	2 cromosomi circulari (2,1 Mb; 1,2 Mb)	
Deinococcus radiodurans	2 cromosomi circulari (2,6 Mb; 0,4 Mb)	2 plasmide circulare (177 kb; 45 kb)
Escherichia coli K12	Un cromosom circular (4,6 Mb)	± plasmide de diferite dimensiuni, în funcție de tulpină
Paracoccus denitrificans	Trei cromosomi circulari (2,0 Mb; 1,1 Mb; 0,64 Mb)	
Pseudomonas aeruginosa	Un cromosom circular (6,3 Mb)	± plasmide de dimensiuni variate, în funcție de tulpină
Rhizobium meliloti	Doi cromosomi circulari (3,4 Mb; 1,7 Mb)	O megaplasmidă circulară (1.400 kb)
Rhodobacter sphaeroides	Doi cromosomi circulari (3,0 Mb; 0,3 Mb)	
Vibrio cholerae	Doi cromosomi circulari (2,9 Mb; 1,1 Mb)	
Xylella fastidiosa	Un cromosom circular (2,7 Mb)	2 plasmide circulare (51 kb; 1,3 kb)

Dogma conform căreia bacteriile posedă un singur cromosom a căzut odată cu dezvoltarea tehnicii electroforezei în câmp pulsatoriu care a permis separarea moleculelor de ADN de dimensiuni mari, inclusiv a celor lineare. Bazându-se pe o asemenea tehnică, Alladert-Servent şi colab. (1993) au demonstrat că *Agrobacterium tumefaciens C58* conţine 4 repliconi: un cromosom circular de 3000 kb, un cromosom linear de 2100 kb, o plasmidă criptică de 450 kb şi o plasmidă Ti de 200 kb.

La procariote, relaţia ADN-cromosom este de totală omologie. De regulă, ADN bacterian nu este complexat cu proteine de tip histone. Recent s-a indicat prezenţa la mai multe grupe bacteriene a unor proteine bazice asemănătoare histonelor (Snyder şi Champness, 1993) dar nu se cunoaşte rolul exact al unor asemenea proteine care se asociază cu ADN bacterian. Se presupune că prin încărcătura electrică pe care o posedă, asemenea proteine neutralizează încărcătura negativă a grupărilor fosfat ale ADN, asigurându-i în felul acesta stabilitatea.

La nivelul cromosomului se găsesc genele implicate în procesele esenţiale supravieţuirii, ele fiind grupate în operoni. Deseori, în afară de informaţia genetică esenţială conţinută de cromosom, bacteriile pot prezenta şi o informaţie genetică suplimentară care poate conferi avantaje selective majore în condiţii modificate de mediu. Majoritatea genelor ce codifică o asemenea informaţie genetică sunt localizate pe plasmide.

Plasmidele sunt elemente genetice extracromosomale, alcătuite din ADN dublu catenar, separate din punct de vedere spaţial de cromosomul bacterian, capabile de replicare autonomă în aceste celule şi care sunt moştenite în mod stabil. Ele sunt repliconi (unităţi genetice capabile de replicare independentă) ce se pot moşteni stabil în stare extracromosomală sau integrate în cromosomul bacterian (caz în care se numesc episomi). Izolate iniţial din celule de *E.coli* (plasmidele F, R şi Col), plasmidele au fost apoi evidenţiate la numeroase alte specii bacteriene. Plasmidele nu sunt componente esenţiale ale bacteriilor dar prezenţa lor, datorită genelor pe care le conţin, conferă avantaje selective celulelor purtătoare. În plus, datorită celor trei funcţii purtate de regiunile *ori, mob* şi *tra*, plasmidele sunt capabile de transfer nu numai orizontal (bacterie-bacterie) ci şi de transfer interregn (bacterii-levuri, bacterii-celule vegetale) (Stachel şi Zambryski, 1989). Transferul plasmidelor se numeşte în acest caz conjugare şi prezintă anumite particularităţi în funcţie de plasmidele implicate şi de bacteriile la care se realizează.

Plasmidele conţin în structura lor determinanţi genetici esenţiali pentru supravieţuirea lor ca entităţi ce se replică fizic independent (gene pentru replicare), gene pentru incompatibilitate şi regiuni neesenţiale, în care sunt localizate gene ce afectează fenotipul bacteriei gazdă (gene de transfer, gene structurale, secvenţe de inserţie, transpozoni etc).

Masa moleculară a plasmidelor variază în limite foarte largi: de la $1,5 \times 10^6$ Da până la 150×10^6 Da sau chiar mai mult la unele plasmide mari.

Cercetări recente au arătat că proprietăţile de formare a nodozităţilor şi/sau fixare a azotului la bacteriile din genul *Rhizobium* sunt determinate tot de gene localizate pe plasmide foarte mari (megaplasmide), a căror dimensiune poate ajunge la 400 - 450 kb sau chiar mai mult (tabelul 5.1).

Clarificarea aspectelor ce ţin de menţinerea, multiplicarea şi segregarea plasmidelor prezintă importanţă practică în cazul elaborării vectorilor de clonare derivaţi de la acestea şi a obţinerii de tulpini bacteriene recombinate, ce conţin şi manifestă stabil informaţie genetică nouă.

Identificate iniţial la porumb de către Barbara McClintock, **elementele genetice transpozabile** au fost evidenţiate şi alte organisme, ele fiind reprezentate de anumite segmente de ADN capabile să-şi modifice poziţia fie pe acelaşi replicon fie pe repliconi diferiţi. Cu toate că elementele genetice transpozabile sunt larg răspândite în lumea vie (bacterii, fungi, insecte, plante, mamifere), cele mai studiate au fost cele de la bacterii.

Cele mai simple elemente genetice transpozabile sunt **secvenţele de inserţie**, ele fiind de dimensiuni mici (aproximativ 800 perechi de baze) şi conţin doar informaţia genetică necesară transpoziţiei (de exemplu, gena pentru transpozază, enzima ce catalizează procesul de transpoziţie). Secvenţele de inserţie sunt flancate de segmente de nucleotide terminale repetate inversat (lungi de 9-41 pb) (figura 5.2).

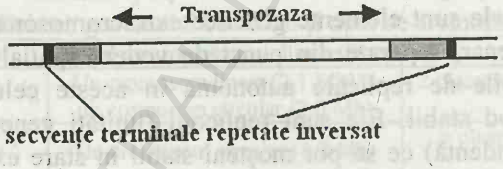


Figura 5.2. Reprezentarea schematică a unei secvenţe de inserţie (IS). Regiunea mărginită de cele două secvenţe terminale repetate inversat codifică pentru sinteza transpozazei.

Secvenţele terminale servesc drept situsuri de recunoaştere pentru transpozază fiind implicate, în acest fel, în mobilizare (transpoziţie). Secvenţele de inserţie se pot găsi în mai multe copii per moleculă de ADN. Cel mai cunoscut exemplu este cel al secvenţelor de inserţie care servesc drept situsuri de recunoaştere şi integrare a plasmidei F în cromosomul tulpinilor de *E.coli*, ele găsindu-se atât la nivelul cromosomului bacterian cât şi la nivelul plasmidei F, conducând în final la formarea celulelor de tip Hfr (Brenner, 1995).

In ceea ce priveşte transpoziţia secvenţelor de inserţie, au fost descrise două mecanisme: conservativ şi replicativ. In primul caz, secvenţa de inserţie este excizată din locusul iniţial şi apoi este inserată la nivelul unui nou locus, astfel încât numărul de secvenţe de inserţie per moleculă de ADN nu se modifică. In cazul mecanismului replicativ al transpoziţiei, o secvenţă de inserţie se integrează într-un nou locus fără ca secvenţa iniţială să fie

excizată ci numai copiată. In acest fel are loc mărirea numărului de secvenţe de inserţie per moleculă de ADN.

Uneori, două secvenţe de inserţie alăturate pot prelua în timpul transpoziţiei segmente specifice de ADN aparţinând cromosomului în care sunt integrate. Rezultă în acest fel un **transpozon** (Tn) ce conţine două secvenţe de inserţie marginale şi, în plus, gene specifice ce conferă un fenotip decelabil celulelor purtătoare (de exemplu, rezistenţă la acţiunea unor antibiotice cum ar fi ampicilină, kanamicină, cloramfenicol etc) (figura 5.3). In alte cazuri transpozonii prezintă secvenţe terminale repetate care nu sunt însă secvenţe de inserţie (de exemplu, transpozonul Tn3).

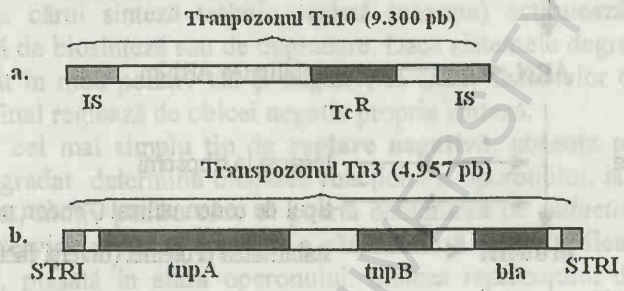


Figura 5.3. Reprezentarea schematică a unor transpozoni: a. Tn10 (IS = secvenţe de inserţie; Tc^R= gena de rezistenţă la tetraciclină); b. Tn3 (STRI = secvenţe terminale repetate inversat; tnpA = gena pentru sinteza transpozazei; tnpB = gena pentru sinteza rezolvazei; bla = gena pentru sinteza β-lactamazei)

Semnificaţia elementelor genetice transpozabile rezidă nu numai din faptul că ele se pot integra în diferite situsuri ale unui replicon sau la nivelul unor repliconi diferiţi, mărind cantitatea de material genetic, ci şi din faptul că ele pot produce modificări în funcţionarea genelor (activează gene "silenţioase" sau inactivează gene normal funcţionale).

5.1.1. Reglarea activităţii genelor

Mecanismele de reglare a activităţii genelor au fost cel mai bine studiate la bacterii, acestea reprezentând, de altfel, un model experimental pentru realizarea unor cercetări variate legate de structura şi funcţiile genelor. In general, se consideră că mecanismele de reglare se exercită la patru nivele principale, cu sensibilitate diferită (Kleinsmith, 1976). Primul nivel, cel mai important, este cel al transcrierii genetice, acesta implicând decizia blocării sau sintezei ARNm. Al doilea nivel, cel mai impresionant, se referă la controlul traducerii genetice ceea ce asigură producerea în cantităţile necesare şi la momentul potrivit a proteinelor. Un al treilea nivel, considerat ca fiind cel mai sensibil şi mai rapid, asigură modificarea directă a activităţii enzimelor existente la nivelul celulei, influenţându-se în acest fel desfăşurarea diferitelor căi metabolice. Ultimul nivel de reglaj celular este reprezentat de degradarea

proteinelor, proces în urma căruia rezultă o parte a aminoacizilor necesari sintezei altor proteine.

Dacă se analizează etapele transferului informației genetice, începând cu nivelul ADN și sfârșind cu proteinele active, se remarcă faptul că fiecare etapă poate fi influențată de o serie de potențiali factori reglatori (figura 5.4).

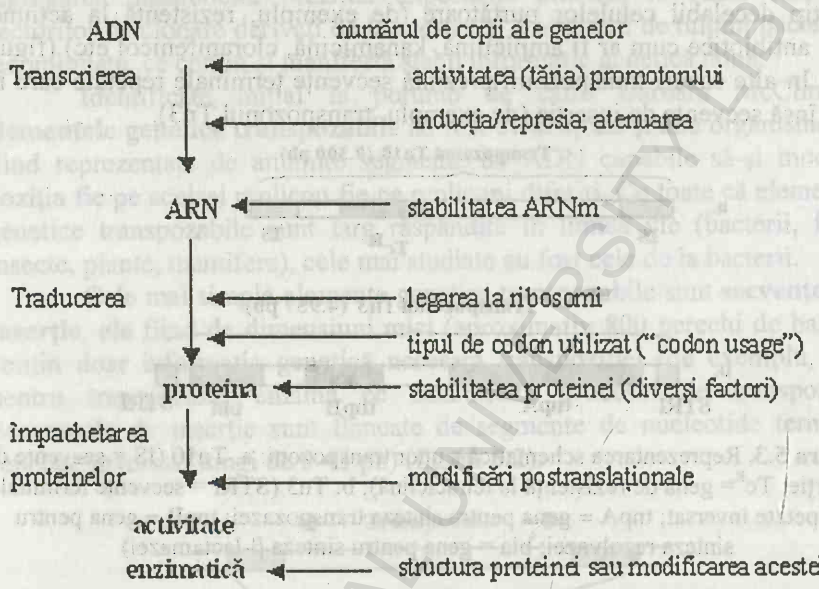


Figura 5.4. Etapele exprimării informației genetice și factorii potențial reglatori la procariote (după Dale, 1998)

In funcție de mecanismele moleculare și de efectele acestora, procesele de reglare pot fi grupate în două mari categorii: reglarea pozitivă și reglarea negativă. In cazul reglării pozitive se consideră că exprimarea anumitor gene este stimulată în prezența unei molecule efector care poate fi o proteină, o moleculă activator de dimensiuni mici sau un complex molecular. Acest sistem necesită, în anumite situații, prezența AMPc și a proteinei CAP (proteina de legare a AMPc) care inițiază transcrierea genetică. In sistemele reglate negativ există un inhibitor care împiedică transcrierea. Acest inhibitor este represorul ce interacționează cu o anumită regiune plasată în fața genelor reglate. Opusul represorului este inductorul care este necesar pentru inițierea procesului de transcriere.

Genele la procariote sunt organizate în operoni, de aceea reglarea activității unei căi metabolice este însoțită de sinteza (sau blocarea sintezei) unui set de enzime și proteine accesorii. Aceasta înseamnă fie că se sintetizează întreg setul, fie nu are loc nici o sinteză. Fenomenul a primit denumirea de reglare coordonată și el rezultă din controlul sintezei unei singure molecule de ARNm policistronic.

În prezent, se cunosc doar puține exemple de blocare completă a transcrierii deoarece, chiar și atunci când se consideră că transcrierea este în stare "oprită", de fapt există un nivel bazal de transcriere ce constă în unul sau două evenimente per generație (Watson și col., 1992). Deci, deși de obicei se utilizează termenul de transcriere "oprită", mai corect ar fi să se spună stare de "încetinire" a transcrierii (nivel foarte scăzut a transcrierii genetice). Într-o singură situație la bacterii, în cazul sporilor, exprimarea majorității genelor este într-adevăr blocată.

Multe dintre mecanismele de reglare a transcrierii la procariote sunt comune: în mod particular unul dintre mecanisme depinde de faptul dacă produsul a cărui sinteză trebuie reglată (enzima) acționează într-o cale metabolică de biosinteză sau de degradare. Dacă sistemele degradative pot fi reglate atât în mod pozitiv cât și negativ; în cazul sistemelor de biosinteză produsul final reglează de obicei negativ propria sinteză.

În cel mai simplu tip de **reglare negativă**, absența produsului ce trebuie degradat determină blocarea funcționării operonului, iar prezența sa îl activează, motiv pentru care el poartă denumirea de *inductor*. In această situație intervine proteina represor a cărei sinteză este codificată de o genă reglatoare, plasată în afara operonului. Sinteza represorului de către gena reglatoare se face fără variații, fiind constitutivă. Rata exactă a acestei sinteze este o funcție a structurii promotorului genei reglatoare. În mod normal, promotorul acestei gene funcționează cu o rată scăzută, ceea ce determină prezența doar a câtorva molecule de ARNm pentru represor, suficiente însă pentru a bloca funcționarea operonului în absența inductorului. Represorul codificat de gena reglatoare este o proteină solubilă, care este difuzibilă din celulă; el are o conformație moleculară specifică, cu mai multe domenii active, care determină proprietățile de recunoaștere și legare, pe de o parte a regiunii operator și, pe de altă parte, a inductorului. Represorul nu este limitat în recunoașterea și legarea doar la moleculele de ADN care poartă informația genetică pentru sinteza proprie, ci el poate acționa ca element de control și asupra altor molecule de ADN (asupra operonilor similari din alte celule). Spre exemplu, mutațiile din gena reglatoare (pentru represor) afectează genele structurale atât din același replicon cât și din alți repliconi. De asemenea, funcția genei reglatoare cromosomale mutantă poate fi suplinită de represorul codificat de o genă reglatoare localizată la nivelul unei plasmide.

Datorită modului specific de acțiune, represorii pot fi considerați ca elemente de control ce acționează în poziție *trans* ("trans-acting control elements"). În contrast, pe baza studiului mutațiilor punctiforme la nivelul promotorilor care au drept consecință blocarea sintezei de ARNm, se consideră că secvențele promotor sunt elemente de reglare ce acționează în poziție *cis*, afectând doar genele structurale ale operonului din care face parte.

La numeroase microorganisme s-a evidențiat un mecanism special de reglare denumit **„represie prin catabolit"**. În acest caz, în timpul creșterii

B. C. U. „M. EMINESCU" IAȘI

microorganismului pe un mediu ce conţine o sursă de carbon simplă, preferată (de exemplu glucoză), transcrierea genelor ce codifică pentru enzimele implicate în catabolizarea altor surse de carbon este blocată. La *E.coli* şi la alte specii bacteriene acest proces este mediat de proteina CRP („catabolite regulation protein") = CAP („catabolite activator protein"). Prezenţa sau absenţa glucozei determină nivelul de concentraţie a unei molecule efector numită AMPc care formează un complex molecular cu proteina CRP. Complexul AMPc-CRP recunoaşte un anumit situs localizat la nivelul promotorul sau în apropierea acestuia şi se leagă la nivelul lui; prezenţa acestui complex determină activarea procesului de transcriere a genelor structurale ale operonului respectiv (figura 5.5).

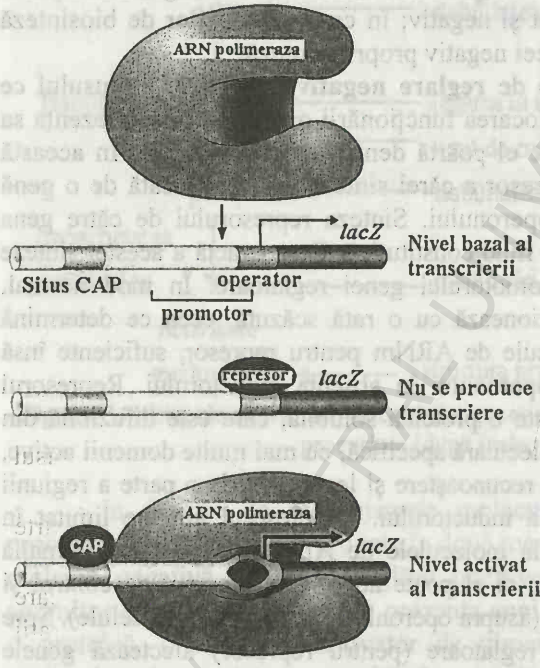


Figura 5.5. Reprezentarea schematică a interacţiunii dintre componentele sistemului de reglare pozitivă şi negativă al operonului *lac* (după Watson şi col., 2004)

De asemenea, exprimarea activităţii unui operon la procariote este reglată nu numai prin controlul transcrierii ARNm policistronic ci concentraţia relativă a proteinelor codificate de acesta este determinată şi de frecvenţa de iniţiere a traducerii fiecărui cistron.

O situaţie specială apare în cazul căilor metabolice de sinteză a anumitor molecule esenţiale (aminoacizi, baze azotate etc), când bacteriile sunt cultivate pe un mediu de cultură, iar acesta nu conţine aminoacizii necesari pentru sinteza proteinelor specifice: bacteriile sunt capabile să suplinească absenţa aminoacidului din mediu prin sinteza sa intracelulară. Aceasta înseamnă că operonul ce codifică enzimele implicate în calea metabolică de sinteză a aminoacidului respectiv este activ deoarece represorul produs de gena reglatoare este sintetizat într-o formă inactivă

denumită *aporepresor* (conformația sa spațială nu este potrivită pentru interacțiunea cu operatorul).

Sinteza produsului de interes (a aminoacidului) are loc în mod continuu, până când concentrația intracelulară a acestuia este prea mare. În acest fel, dacă funcționarea operonilor inductibili este declanșată de prezența substanței ce trebuie degradată, funcționarea operonilor de tipul menționat mai sus este blocată atunci când concentrația produsului final (substanța sintetizată) atinge un anumit nivel. Se realizează, ceea ce se numește, **represia sintezei enzimei,** iar produsul final al căii metabolice a primit denumirea de *corepresor.* Rolul corepresorului este de a interacționa specific cu aporepresorul, activându-l prin modificarea conformației moleculare (modificare alosterică), astfel încât acesta se leagă la operator și blochează transcrierea genelor structurale.

Mecanismul de reglare prin represie enzimatică a fost descris în cazul operonilor histidină, leucină, triptofan, arginină etc. În practică, cunoașterea mecanismelor reglatoare și în special a represiei enzimatice este foarte importantă deoarece permite elaborarea unor modalități de creștere a biosintezei unor enzime de interes biotehnologic. Prin aceste căi de stimulare a biosintezei unor enzime menționăm (Zarnea, 1986):

- limitarea prezenței și acumulării produșilor finali în mediu prin utilizarea ca sursă de carbon a unor compuși diferiți de cei normali pentru derularea căii metabolice urmărite;
- limitarea producerii intracelulare a produșilor finali prin adăugarea în mediu a unui inhibitor al căii metabolice;
- "înfometarea" parțială a unei mutante auxotrofe cu produsul final necesar pentru creștere;
- utilizarea unui derivat al produsului final care este folosit foarte lent în metabolismul bacteriei respective;
- utilizarea unor mutante de reglare (mutante constitutive) care produc enzimele de interes chiar și în prezența unor concentrații crescute de produși finali.

Supraproducția de intermediari metabolici cu greutate moleculară mică (aminoacizi, baze azotate purinice și pirimidinice) poate deveni toxică pentru celula bacteriană producătoare. Depășirea acestei situații este asigurată prin mecanisme specifice dintre care, cel mai frecvent utilizat este inhibiția activității enzimelor. Mecanismul respectiv a primit denumirea de inhibiție prin produs final, retroinhibiție sau inhibiție prin feedback, fiind cunoscut și ca efectul Novick-Szilard (Zarnea, 1986). Inhibiția prin feedback este un mecanism foarte sensibil și rapid decât reglarea transcripțională care permite modularea cantității de produs final al unei căi metabolice (Snyder și Champnes, 1997).

Cel mai cunoscut exemplu, la *E.coli*, este cel al biosintezei L-izoleucinei pornind de la L-treonină printr-o cale metabolică formată din

cinci etape, catalizată fiecare de câte o enzimă specifică. Astfel, dacă o tulpină de *E.coli* este cultivată în prezența L-izoleucinei, acest aminoacid blochează activitatea primei enzime, L-treonin-deaminaza, a căii metabolice care, în mod normal asigură transformarea L-treoninei în α-cetobutirat. Inactivarea enzimei respective împiedică formarea produsului intermediar menționat și, în felul acesta, restul enzimelor din lanțul respectiv sunt lipsite de produșii intermediari asupra cărora acționau, iar calea de biosinteză este, în felul acesta, blocată.

Activitatea căii metabolice respective rămâne blocată atâta timp cât există L-izoleucină în mediu; atunci când acest aminoacid lipsește, enzima L-treonin-deaminaza este activă, determină producerea primului produs intermediar, iar celelalte enzime continuă procesul de biosinteză rezultând aminoacidul de interes.

5.2. GENOMUL MICROORGANISMELOR EUCARIOTE

5.2.1. Genomul levurilor

Caracterul distinctiv al levurilor în comparație cu ceilalți fungi este acela al organizării unicelulare și absența unui miceliu coenocitic. Cu toate acestea au fost descrise specii de levuri care formează un pseudomiceliu sau chiar un miceliu septat (Bonaly, 1991).

Genomul levurilor este cel mai mic dintre genomurile eucariote cunoscute: el are aproximativ 14.000 kilobaze, fiind de aproximativ 4 ori mai mare decât cel de la *E.coli* și cuprinzând 10.000 gene cartate recent (1996). Majoritatea genelor sunt distribuite pe cromosomi lineari ce conțin mai mult de 95% din ADN levurian; o parte mai mică se găsește la nivelul ADN mitocondrial (ADN circular) și pe alte elemente extranucleare (plasmide circulare, plasmide lineare de tip ADN sau ARN, retro-transpozoni).

Tehnica electroforezei în câmp pulsatoriu a permis separarea în gel de agaroză a cromosomilor de la diferite specii de levuri: pe baza unui studiu efectuat pe 22 specii de levuri au fost evidențiate deosebiri semnificative în ceea ce privește numărul de cromosomi. Spre exemplu, la *Saccharomyces cerevisiae* au fost evidențiați 16 cromosomi (figura 5.6), în timp ce *Schizosaccharomyces pombe* conține doar 3 cromosomi.

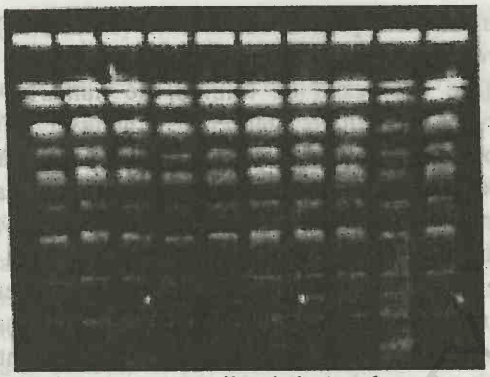


Figura 5.6. Evidenţierea cromosomilor de la *Saccharomyces cerevisiae* prin electroforeză în câmp pulsatoriu (după Vassu şi col., 2001)

Marea majoritate a genelor de la *S.cerevisiae* au structură continuă şi doar o mică parte sunt gene cu structură discontinuă (cu introni şi exoni), în timp ce la *S.pombe* raportul este invers. De obicei, genele drojdiilor se găsesc într-un singur exemplar per genom haploid dar, uneori ele pot forma familii multigenice. Este cazul genelor ce codifică ARNt sau genele implicate în asimilarea maltozei (maltazele) sau zaharozei (invertaza) care se găsesc în mai multe exemplare răspândite la nivelul întregului genom. Fenomenul conferă avantaj selectiv drojdiilor ţinând cont că ele populează medii în care se găsesc cantităţi mari de glucide.

Informaţia genetică purtată de cromosomi este menţinută relativ constanta de-a lungul generaţiilor prin intervenţia mecanismelor reparatorii ce contracarează efectul unor agenţi mutageni naturali. Cu toate acestea, segregarea cromosomilor în cursul meiozei (recombinarea intercromosomală) precum şi mecanismele de recombinare ce afectează genele determină variaţii în ceea ce priveşte transferul şi exprimarea la descendenţi a anumitor gene cromosomale. În plus, au fost identificate o serie de elemente genetice transpozabile, dintre care cel mai bine studiat este retrotranspozonul Ty de la *S.cerevisiae.* Prin integrarea elementului Ty la nivelul unor situsuri variate se pot modifica structura şi funcţiilor unor gene cromosomale.

Existenţa mitocondriilor în celulele drojdiilor a ridicat problema studiului genelor mitocondriale ce codifică proteinele mitocondriale specifice, ştiut fiind faptul că majoritatea proteinelor implicate în procesele metabolice ce se desfăşoară în aceste organite sunt codificate de gene nucleare. Studiile efectuate cu mutante de levuri incapabile de a utiliza substraturi organice nefermentate, de tipul glicerolului sau lactatului (mutante notate *rho*$^-$ şi denumite "petite"), au permis identificarea proteinelor şi apoi a genelor codificatoare, localizate la nivelul **ADN mitocondrial (ADNmt).**

ADNmt nu prezintă o structură cromatinică dar este asociat cu o proteină asemănătoare proteinelor histonice; el conţine atât gene cu structură

continuă (nemozaicate) cât şi gene discontinue (mozaicate). La *S.cerevisiae* ADNmt este reprezentat de o moleculă circulară de ADN, cu o lungime de 74-85 Kb, variaţiile depinzând de tulpină, de numărul de introni şi de abundenţa de secvenţe repetitive intergenice bogate în AT; el se găseşte în mai multe exemplare per celulă. In ceea ce priveşte numărul şi tipurile de gene pe care le conţine ADNmt, acestea sunt relativ constante la specii sau chiar genuri diferite. S-a dovedit că ADNmt de la *S.cerevisiae* şi cel de la *S.pombe* conţin următoarele tipuri de gene, deşi ordinea lor pe genomul mitocondrial este diferită: genele pentru ARNt (24 de gene nemozaicate), două gene pentru ARNr (ARNr 21S şi ARNr 15S) şi şapte gene (unele mozaicate altele cu structură continuă) ce codifică sinteza mai multor polipeptide (apocitocromul b, trei subunităţi ale citocrom-oxidazei şi trei subunităţi ale ATP-azei mitocondriale).

Viabilitatea mutantelor *rho*$^-$ evidenţiază adaptarea drojdiilor la fermentaţia alcoolică, chiar în condiţii aerobe; aceasta corespunde cu existenţa la levuri a efectului Crabtree (fenomen invers efectului Pasteur) care favorizează fermentaţia alcoolică a glucidelor în prezenţa oxigenului.

Rolul mitocondriilor (deci al genelor mitocondriale) în reglarea sistemelor de fermentaţie a fost demonstrat de Hanssmann şi Zimmermann (1976) care au studiat efectul mutantelor „petite" asupra acţiunii inhibitorii a glucozei exercitate în sinteza invertazei. De asemenea, diferiţi produşi ai unor gene mitocondriale sunt implicaţi în procesele de sporulare, germinare şi proliferare celulară. Mai mult, unele mutaţii la nivelul genelor mitocondriale (mutante "petite") au drept consecinţă alterări ale suprafeţei celulare şi anume modificări ale frecvenţei, distribuţiei sau accesibilităţii unor situsuri de legare membranară a unor compuşi variaţi (cum ar fi concanavalina A)(Anghel şi Vassu, 1991) (figura 5.7).

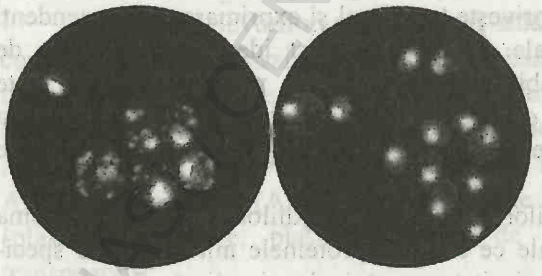


Figura 5.7. Evidenţierea conţinutului în ADN mitocondrial a celulelor *rho*$^+$(a) şi *rho*$^-$ (b) de *S.carlbergensis* după colorarea ADN celular cu DAPI (2,6-diamidino-phenilindol)(după Salek şi col., 1992)

Fenomenul de floculaţie, fenomen cu importanţă majoră pentru industria fermentativă, în special pentru cea a berii, reprezintă agregarea celulelor dispersate spre sfârşitul fermentaţiei şi are drept consecinţă separarea "flocoanelor" (a celulelor agregate) de lichidul de suspendare, uşurând procesele de filtrare următoare. Floculaţia depinde de unele particularităţi ale peretelui celular, fenomenul având un control genetic

dublu: nuclear şi mitocondrial. Implicarea genelor mitocondriale în controlul acestui fenomen a fost dovedită prin studierea unor diferite tipuri de mutante "petite", rezultatele fiind extrem de încurajatoare pentru obţinerea de tulpini de levuri modificate genetic, cu o capacitate floculantă şi de biosinteză a alcoolului ameliorată.

În afara genelor localizate la nivelul cromosomilor nucleari, la drojdii au mai fost puse în evidenţă o serie de **elemente genetice extracromosomale** care segregă non-mendelian şi care sunt localizate în afara cromosomilor: plasmide nucleare şi citoplasmatice, elemente transpozabile, gene de origine virală etc.

Astfel, s-a dovedit că un număr foarte mare de levuri conţin o plasmidă de 6,3 Kb, a cărei lungime este de 2 μm (determinată pe baza unor măsurători efectuate la microscopul electronic), de unde şi numele sub care această plasmidă este cunoscută – **plasmida de 2μm** (Fuchter, 1988).

Studiile iniţiale asupra acestei plasmide izolată de la *S.cerevisiae* au considerat că aceasta este un element genetic citoplasmatic dar ulterior, analizele mai complexe au dovedit, pe de o parte, localizarea sa nucleară şi, pe de altă parte, structura sa nucleosomală (Vassu şi col., 2001). Replicarea plasmidei de 2 μm se realizează o singură dată în timpul ciclului celular mitotic, în decursul fazei S; procesul este iniţiat de la nivelul unui singur situs din molecula plasmidială, şi anume de la regiunea ARS, şi este dependentă de acelaşi set de proteine de care depinde şi replicarea ADN cromosomal (figura 5.8).

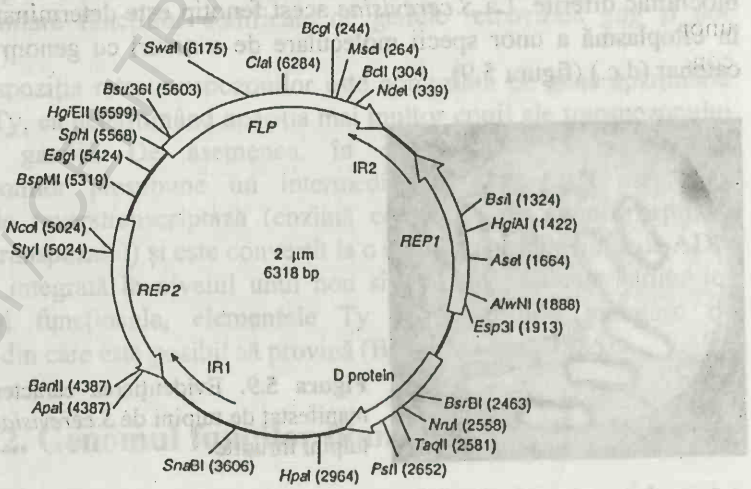


Figura 5.8. Evidenţierea particularităţilor plasmidei de 2μm (după Ausubel şi colab., 1995)

Plasmida 2μm este prezentă în majoritatea celulelor, într-un număr foarte mare de copii: celulele haploide conţin 60-100 de copii, iar numărul lor creşte cu gradul de ploidie. De asemenea, plasmida 2μm nu se ataşează la

lor creşte cu gradul de ploidie. De asemenea, plasmida 2μm nu se ataşează la fibrele fusului de diviziune astfel că repartizarea copiilor plasmidiale în celulele fiice se realizează randomic, procesul fiind reglat de gene plasmidiale. Prezenţa plasmidei 2μm în celulele de levuri nu este asociată cu nici un fenotip deosebit, deşi celulele lipsite de plasmide par a avea un timp de generaţie mai scurt (cu 1,5-3% mai scurt comparativ cu celulele cu plasmide).

In afară de plasmida 2 μm de la *S.cerevisiae*, s-au identificat şi alte asemenea plasmide (cel puţin 6) la diferite specii de levuri: PSB1 şi pSB2 de la *Zygosaccharomyces bailii*, pSR1 de la *Z.rouxii*, pSB31 de la *Z.bisporus*, pSM1 de la *Z.fermentati* şi pKD1 de la *Kluyveromyces drosophilarum* (Stoica, 1997).

Nivelul ridicat al stabilităţii plasmidei 2μm, numărul mare de copii per celulă, precum şi unele caracteristici ale funcţionării unor gene plasmidiale au determinat ca această plasmidă să fie utilizată în experimentele de "construire" a unor vectori de clonare specifici pentru levuri, utilizabili în experimente de inginerie genetică ce au drept scop obţinerea de noi tulpini de levuri cu însuşiri îmbunătăţite.

O altă caracteristică a multor tulpini de levuri, asociată cu un determinism genetic extracromosomal, este aceea a sintezei unor toxine glicoproteice capabile de a omorî alte tulpini înrudite (**caracterul "killer"**) şi faţă de care tulpina producătoare este imună. Fenomenul a fost descoperit pentru prima oară în 1963 la *S.cerevisiae,* ulterior fiind descris şi la alte genuri şi specii de levuri, în prezent fiind cunoscute 11 tipuri de toxine killer, biochimic diferite. La *S.cerevisiae* acest fenotip este determinat de prezenţa în citoplasmă a unor specii moleculare de virusuri cu genom ARN dublu catenar (d.c.) (figura 5.9).

Figura 5.9. Evidenţierea caracterului „killer" manifestat de tulpini de *S.cerevisiae* asupra unor tulpini înrudite

În cazul fenomenului killer identificat la alte specii de levuri, cum ar fi *Klyveromyces lactis,* s-a dovedit că este determinat de două plasmide formate din ADN d.c. linear: p6K11 şi p6K12. Plasmida p6K11 conţine genele responsabile de sinteza şi eliberarea toxinei killer şi a factorului de imunitate, iar plasmida p6K12 este responsabilă de menţinerea şi replicarea

ambelor tipuri de plasmide. Ca şi în cazul *S.cerevisiae,* toxina killer produsă de tulpinile de *K.lactis* suferă procese post-translaţionale

In ceea ce priveşte importanţa fenomenului killer pentru procesele biotehnologice, se poate aprecia că el ar putea asigura protecţie procesului de fermentaţie (vinificaţie) realizat tulpini de levuri de vin selecţionate (care manifestă caracterul killer sau care sunt rezistente la acţiunea toxinei). De asemenea, sistemul killer poate constitui un factor de selecţie în fuziunea de protoplaşti şi poate servi pentru biotiparea unor tulpini de levuri şi de bacterii.

Transpozonii levurilor. O categorie specială de elemente transpozabile o reprezintă retrotranspozonii (elementele Ty = "transposon yeast") identificaţi la drojdii. Deşi există multe deosebiri între elementele Ty, s-a dovedit că ele prezintă o structură similară: au aproximativ 6,3 kb lungime având la capete secvenţe de câte 330 pb repetate direct, secvenţe notate delta (δ). Între cele două secvenţe δ se găsesc două regiuni de tip ORF ("open reading frame" = cadru cu citire deschisă), notate *TyA* şi *TyB*. Elementul Ty este transcris în două tipuri de ARNm poli(A), procesul de transcriere începând, în ambele cazuri, de la nivelul unui promotor localizat la nivelul secvenţei δ din partea stângă a retrotranspozonului.

Transcrierea se termină, în cazul primului tip de ARNm, după 5kb, iar în cazul celui de-al doilea tip de ARNm după 5,7 kb, la nivelul secvenţei ä din partea dreaptă. Studiile realizate cu asemenea transpozoni sugerează că *TyA* codifică o proteină de legare la ADN în timp ce *TyB* conţine regiuni care prezintă omologie cu secvenţe din retrovirusuri (secvenţe ce codifică reverstranscriptaza, proteaza şi integraza). Organizarea şi funcţiile *TyA* şi *TyB* sunt similare funcţiilor codificate de genele retrovirale *gag* şi *pol* (Lewin, 1997).

Transpoziţia retrotranspozonilor este controlată de gene aparţinând elementului Ty, ea determinând apariţia mai multor copii ale transpozonului în genomul gazdei. De asemenea, în mod particular, transpoziţia retrotranspozonilor presupune un intermediar de tip ARN care este recunoscut de reverstranscriptază (enzimă codificată de gene aparţinând elementului transpozabil) şi este convertit la o copie complementară de ADN ce este apoi integrată la nivelul unui nou situs. Prin particularităţilor lor structurale şi funcţionale, elementele Ty de la drojdii amintesc de retrovirusuri din care este posibil să provină (Boecke şi col., 1985).

5.2.2. Genomul fungilor filamentoşi

Fungii sunt eucariote heterotrofe, incapabile de fotosinteză, care îşi obţin energia prin oxidarea compuşilor organici. Ei se găsesc în special în sol unde participă la degradarea unor substraturi foarte variate; pot prezenta un mod de viaţă saprofit sau parazit (parazitează plantele, animalele şi omul).

Reproducerea fungilor filamentoşi se realizează prin germinarea sporilor: se formează mai întâi o hifă din care apoi se regenerează miceliul care poate fi haploid, diploid sau dicariotic (heterocarion sau homocarion). La fungi au fost descrise două tipuri de reproducere: asexuată şi sexuată. În cadrul fungilor au fost însă evidenţiate numeroase specii care au pierdut capacitatea de a se reproduce sexuat, ele fiind grupate în categoria „fungi imperfecţi". In acest grup sunt cuprinse multe dintre speciile de fungi filamentoşi importante din punct de vedere biotehnologic.

Cercetările asupra ciclurilor de viaţă ale multor specii de fungi au evidenţiat o serie de diferenţe, iar în cazul speciilor ce se reproduc exclusiv asexuat s-a dovedit că există fenomene de parasexualitate. Procesul de parasexualitate a fost descris în detaliu la multe genuri de fungi: *Verticillium, Aspergillus, Cephalosporium, Fusarium, Penicillium, Humicola, Beauveria, Paecilomyces*; el presupune parcurgerea mai multor etape (Hartman şi col., 1998):

- două celule aparţinând unor tulpini diferite fuzionează printr-un proces natural de anastomoză sau, „in vitro", prin fuziunea protoplaştilor;
- se formează un tal care este un heterocarion, conţinând nucleii ambelor celule parentale;
- are loc fuziunea nucleilor de origine diferită, unul de la o tulpină şi altul de la cealaltă tulpină, doi câte doi, formând câte un diploid recombinat;
- nucleii heterozigoţi rezultaţi se multiplică alături de nucleii haploizi parentali în noile condiţii heterocariotice;
- uneori, se pot forma diploizi homocariotici care se stabilizează şi devin noi tulpini, distincte faţă de cele parentale;
- în cursul multiplicării tulpinii diploide se poate produce procesul de crossing-over mitotic;
- are loc eliminarea progresivă a unor cromosomi, rezultând în final o tulpină haploidă recombinată.

Faptul că fuziunea celulară determină procesul de recombinare genetică la fungii filamentoşi, au fost realizate o serie de cercetări asupra posibilităţii inducerii „in vitro" a acestui fenomen, prin utilizarea protoplaştilor. Numeroase cercetări au fost realizate în cazul speciilor de fungi producătoare de enzime (*Aspergillus, Trichoderma*) sau de antibiotice (*Penicillium*), obţinându-se o serie de tulpini recombinate cu particularităţi utile.

În privinţa particularităţilor genetice ale fungilor filamentoşi, există mai puţine date comparativ cu cele ce se referă la bacterii sau drojdii. O serie de date se referă la fungii din genurile *Aspergillus, Neurospora* sau *Penicillium* la care, de altfel au fost aplicate şi o serie de tehnici moleculare în vederea transferului şi exprimării unor gene de interes. In ultimii 10 ani o

atenţie specială a fost acordată unui alt grup de fungi, celor din genul *Trichoderma.* Aceşti fungi sunt folosiţi pentru producerea unui număr mare de tipuri de enzime litice şi drept agenţi biologici pentru combaterea unor fungi fitopatogeni.

Datorită dimensiunilor extrem de reduse, numărul şi mărimea exactă a cromosomilor fungilor filamentoşi sunt dificil de stabilit dacă se utilizează doar metodele de microscopie (Zolan, 1995). Dezvoltarea şi diversificarea tehnicilor de electroforeză în câmp pulsatoriu (PFGE) a permis realizarea cariotipării electroforetice la mai multe specii de fungi. Astfel, în cazul speciilor de *Trichoderma*, s-a dovedit că lungimea genomului este de aproximativ 31-39 Mb, iar numărul de cromosomi variază între 3 şi 7, chiar între tulpinile din cadrul aceleiaşi specii. Cu toate acestea polimorfismul cromosomal la fungii filamentoşi se apare mai rar comparativ cu levurile, iar atunci când se produce noul cariotip rămâne stabil pentru mai multe sute de generaţii (Zolan, 1995).

Aplicarea unui tip special de electroforeză în câmp pulsatoriu (CHEF) s-a reuşit cariotiparea mai multor specii de fungi, cum ar fi: *Beauveria* (specie entomopatogenă), *Tolypocladium, Metarhyzium* sau *Paelomyces.* De exemplu, prin examinarea a nouă tulpini de *Beauveria bassinia* s-a dovedit că acestea conţin între 5 şi 8 cromosomi cu dimensiuni variind între 1,2 şi 7,7 Mb. Aceste cercetări au mai evidenţiat faptul că apare un polimorfism de dimensiune a cromosomilor între tulpinile aparţinând aceleiaşi specii, iar localizarea anumitor gene pe cromosomi poate fi diferită. Spre exemplu, gena pentru β-tubulină este localizată, la tulpinile analizate, pe cromosomi cu dimensiuni variate: 7,7; 5,4; 5,2; 4,8 sau 4,4 Mb.

De asemenea, diferenţe la nivel de cariotip au mai fost evidenţiate şi la specii de fungi fitopatogeni: *Fusarium oxysporum, Septoria nodorum, S.tritici, Leptosheria maculans, Nectria haematococca.* În schimb, la specia *Aspergillus nidulans*, la tulpinile capabile de reproducere sexuată, variaţia cariotipului se reduce doar la cei mai mici cromosomi (mai mici de 2 Mb) (Harman şi col., 1998).

Kistler şi Miao (1992) au avansat o ipoteză care încearcă să explice apariţia şi menţinerea polimorfismului cromosomal de la fungii filamentoşi. Astfel, fungii filamentoşi pot prezenta doar rareori ciclu sexuat, ceea ce înseamnă că nu este necesar procesul de meioză care necesită împerecherea cromosomilor omologi. De aceea, se poate spune că polimorfismul cromosomal previne sau chiar exclude procesul de recombinare intraspecific, tulpinile fiind incompatibile din punct de vedere sexual. Mai mult, odată ce a atins un anumit nivel, polimorfismul cromosomal determină izolarea genetică a tulpinilor ceea ce conduce la apariţia de populaţii independente (Goldman şi colab., 1998).

Plasmidele mitocondriale de la fungii filamentoşi pot fi lineare (1,1-9,2kb) sau circulare (0,8-5,2 kb), ele găsindu-se de obicei într-un număr mare de copii per celulă (Samac şi Leong, 1989). Deoarece plasmidele nu

sunt pierdute de tulpinile de laborator care le conţin, se poate spune că ele sunt elemente genetice stabile deşi ele nu sunt esenţiale pentru creşterea normală a celulelor. Se pare că plasmidele mitocondriale fungice pot codifica diferite ADN polimeraze, ARN-polimeraze sau reverstranscriptaze, pot fi implicate în procesul de senescenţă sau pot fi criptice (Arganoza şi col., 1995). În cazul anumitor specii de fitopatogeni s-a dovedit că unele plasmide lineare conţin informaţia genetică asociată cu spectrul de gazdă a tulpinilor respective. Astfel, la *Fusarium oxysporum* ssp.*conglutinans* cercetările asupra a trei tulpini patogene au arătat că acestea conţin plasmide lineare specifice care determină ca două dintre tulpini să determine boli doar la varză, iar a treia tulpină să infecteze doar ridichile (Kistler şi Leong, 1986).

Plasmidele lineare, deseori numite invertroni, prezintă secvenţe terminale repetate inversat, iar la extremităţile 5' se găsesc proteine legate covalent. Ele au fost izolate de la numeroase specii de fungi cum ar fi: *Agaricus, Ascolobus, Claviceps, Fusarium, Morchella, Podospora, Trichoderma, Pleurotus sau Neurospora.* În cazul plasmidelor mitocondriale circulare identificate la specii de fungi cum ar fi: *Cochliobolus, Neurospora* şi *Podospora*, originea acestora pare a fi genomul mitocondrial (Hartman şi col., 1998).

Elementele genetice transpozabile au fost identificate la numeroase specii de fungi, dovedindu-se că acestea contribuie la creşterea variabilităţii acestor organisme, iar la fungii fitopatogeni determină o creştere a pato-genităţii şi a specificităţii de gazdă. Aşa cum se cunoaşte, transpozonii au două caracteristici definitorii: îşi pot schimba localizarea atât intra- cât şi intergenomic şi se pot găsi într-un număr mare de copii per genom (Boecke, 1989).

Prezenţa transpozonilor la fungii fitopatogeni poate afecta patogenitatea acestora. De exemplu, la tulpinile de *Magnaporthe grisea* care infectează orezul, în genomul acestora au fost identificate aproximativ 50 copii se secvenţe repetate, în timp ce în genomul tulpinilor ce infectează alte monocotiletodate numărul copiilor acestor secvenţe a fost mult mai mic. In cazul tulpinilor de *Fusarium oxysporum* au fost identificate cel puţin şase tipuri de elemente transpozabile, iar compararea distribuţiei acestor elemente între diferitele tulpini aparţinând acestei specii a indicat o posibilă corelaţie între structura populaţiei şi epidemiologie (Daboussi şi Langin, 1994). Astfel, tulpinile aparţinând acestei specii pot infecta peste 100 specii vegetale, existând o serie de forme specializate, capabile de a determina boli doar la anumite plante gazdă. Deşi bazele moleculare ale acestui fenomen nu sunt cunoscute, se presupune că mutaţiile reprezintă sursa majoră de variabilitate, iar transpozonii contribuie la intensificarea acestui fenomen (inactivează genele la nivelul cărora se integrează sau stimulează exprimarea altora).

5.3. MUTAȚIILE ȘI MUTAGENEZA

Elementul fundamental al analizei genetice și al modificărilor materialului genetic al microoganismelor a fost reprezentat, până nu demult, de izolarea unor mutante specifice. Termenul de **mutant** se referă la un organism care rezultă dintr-un organism normal dar care prezintă anumite diferențe. Aceste diferențe se manifestă prin apariția unor modificări fenotipice mai mult sau mai puțin evidente. De exemplu, în cazul unei populații bacteriene (de *E.coli*, de exemplu) obținută în urma diviziunilor succesive ale unei singure celule (în decursul a 10-15 ore se formează aproximativ 10^9 celule/ml, ceea ce înseamnă aproximativ 30 generații) pot apărea o serie de celule care prezintă modificări datorate fie unor efecte fiziologice fie unor schimbări la nivel genetic. Schimbările la nivel genetic se numesc mutații, ele putând fi moștenite de generațiile următoare. Uneori, aceste modificări pot fi „reparate", iar celulele respective redobândesc fenotipul normal (Dale, 1998).

Pentru a clarifica termenii utilizați în experimentele de mutageneză se poate recurge la următorul exemplu: o cultură de *Pseudomonas fluorescens* are drept particularitate faptul că, pe mediu agarizat formează colonii verzui. Uneori, în mod spontan, printre coloniile colorate apare și una fără culoare care a rezultat prin multiplicarea unei celule mutante. Fenotipul mutant este, în acest caz lipsa culorii, iar fenotipul normal este culoarea verde a coloniei. Bacteriile mutante prezintă o mutație la nivelul genei ce codifică sinteza unei enzime necesare pentru producerea pigmentului verde. In acest fel, bacteriile mutante și cele de tip sălbatic (normale) conțin gene alele (alela normală pentru culoarea verde și, respectiv alela mutantă).

În exemplul de mai sus mutația produsă la nivel genetic poate fi cunoscută datorită efectului fenotipic pe care l-a determinat (Snyder și Champness, 1997). Există însă numeroase situații în care, deși există modificări la nivelul unor secvențe de ADN, acestea nu pot fi identificate rapid deoarece nu determină nici o diferență față de fenotipul normal. Se spune în acest caz că **mutațiile sunt „tăcute"** („silent mutations").

În ceea ce privește notația mutațiilor există mai multe variante. De exemplu, notația *his* se referă la o genă ce codifică o enzimă necesară pentru sinteza aminoacidului histidină. Uneori, există mai multe gene ce codifică proteine cu funcții asemănătoare: *his A* și *his B* sunt gene ce codifică polipeptide necesare pentru biosinteza histidinei. Notația *his* A^- se referă la mutația ce afectează gena respectivă și care nu mai permite sinteza polipeptidului normal. Reciproc, notația *his* A^+ desemnează gena alelă normală (de tip sălbatic). Uneori pentru notarea genei mutante se folosesc cifre arabe care însoțesc denumirea genei normale: de exemplu, *his A4* se referă la gena *his A* cu mutația numărul 4 (alela 4 a genei respective). Atunci când mutația determină modificarea genei de tip sălbatic și conduce la

apariția unei alele, ea se numește „**mutație înainte**", iar când are loc revenirea la tipul normal, mutația se numește „**mutație de reversie**".

Pentru desemnarea fenotipurilor normale sau mutante, notațiile sunt similare celor pentru gene, cu deosebirea că prima literă este a majusculă: de exemplu, notația His^- se referă la fenotipul unui organism incapabil să crească pe un mediu minimal lipsit de histidină; notația Rfm^r se referă la un organism rezistent la acțiunea rifampicinei, în timp ce Lac^- indică incapacitatea organismului respectiv de a metaboliza lactoza.

Structura materialului genetic poate fi modificată în mai multe moduri, consecințele fiind, de obicei, apariția unor fenotipuri diferite de celulele normale. Structura, proprietățile fizice sau biologice ale proteinelor se datorează succesiunii de aminoacizi, astfel că orice schimbări ale acesteia, datorate unor modificări ale genelor codificatoare, conduc la noi proprietăți ale proteinelor în cauză.

Ca urmare, orice modificare a unui aminoacid în structura unei proteine se datorează unor mutații la nivelul genei codificatoare. Cu toate acestea, nu toate modificările de la nivelul genelor sunt urmate de efecte fenotipice evidente; în acest caz se spune că genele sunt „tăcute" („silent genes").

Clasificarea mutațiilor ține cont de mai multe criterii: mărimea secvenței de ADN afectate, efectul mutației, modul de producere etc.

Mutațiile pot apărea în mod spontan (**mutații spontane** sau **naturale**), cu o rată foarte scăzută, ele fiind cauzate de o serie de factori naturali, cum ar fi: erorile de replicare a ADN, leziunile spontane ale ADN, modificări structurale ale unor baze azotate etc

Deseori însă mutațiile pot fi induse prin utilizarea unor agenți mutageni variați (**mutații induse** sau **artificiale**), ele determinând, cu o frecvență sporită, înlocuirea unor baze normale, modificări ale bazelor urmate de împerecheri anormale, eliminarea unor perechi de baze urmată de blocarea replicării etc. Descoperirea efectului mutagen al radiațiilor X se datorează experimentelor realizate de Hermann Muller (1927).

Frecvența de apariție a mutațiilor spontane este variată, în funcție de organismul examinat dar, în general, este scăzută. Astfel, la om rata de apariție a unei mutații variază între $1x10^4$ și $1x10^6$ per genă, per generație, în funcție de locusul implicat.

Mutațiile pot fi **genice** (pot avea loc la nivelul oricărei gene) sau **cromosomale** (determină modificări ale structurii și numărului cromosomilor de la eucariote). Unele mutații pot să afecteze o singură pereche de nucleotide, ele primind denumirea de **mutații punctiforme.**

Pentru analiza genetică sunt folosite anumite tipuri de mutante. Dintre acestea menționăm:

- **mutantele auxotrofe**: sunt organisme care nu se pot multiplica pe medii minimale în absența adăugării unor factori de creștere (prezintă modificări la nivelul unor gene ce codifică enzime implicate în căile de

biosinteză a unor aminoacizi, baze azotate etc) sau care nu pot utiliza pentru creştere anumite substanţe (genele afectate împiedică desfăşurarea normală a unor căi metabolice de degradare).

- **mutante condiţionat letale** („conditional lethal mutations"): sunt organisme care prezintă anumite modificări ce determină moartea organismului în anumite condiţii (condiţii restrictive sau nonpermisive) sau supravieţuirea acestuia în altele (în condiţii permisive). În această categorie intră mutantele sensibile la temperatură: de exemplu, la *Bacillus stearothermophilus*, o mutantă termosensibilă sintetizează anumite proteine inactive atunci când este cultivată la 55°C (temperatura nonpermisivă), în timp ce la temperatura de 47°C (temperatura permisivă) proteinele sintetizate prezintă funcţii normale.

Un alt tip de mutaţii sunt cele **morfologice**. Acestea sunt uşor de observat, ele referindu-se la forma corpului, mărimea, culoarea sau forma şi dimensiunile coloniilor bacteriene (figura 5.10).

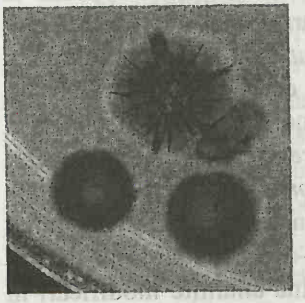


Figura 5.10 Colonie de *E.coli*, de dimensiuni mari, cu sectoare specifice, rezultată în urma acţiunii unor agenţi mutageni asupra celulelor bacteriene

Deseori mutaţiile determină moartea celulelor afectate, fiind astfel letale, iar alteori conferă anumite avantaje selective celulelor afectate (de exemplu, rezistenţa la anumite antibiotice, la acţiunea unor virusuri etc).

Aşa cum s-a precizat deja, modificările spontane ale ADN ce determină apariţia unei mutaţii pot implica un număr variat de perechi de nucleotide: de la o singură pereche (mutaţii punctiforme) la sute de perechi de nucleotide (mutaţii genice sau cromosomale). La rândul lor, mutaţiile punctiforme pot fi datorate substituirii unei perechi de nucleotide de către alta (**mutaţii prin substituţie**), eliminării (**deleţiei**), inserării unei noi perechi de nucleotide (**adiţie**), inversării unei anumite secvenţe de nucleotide (**inversii**) sau duplicaţiilor.

a) Mutaţiile prin substituţie pot fi, la rândul lor, clasificate în funcţie de nucleotida înlocuită:

- mutaţiile de tip tranziţie constau în înlocuirea unei purine cu o altă purină sau a unei pirimidine cu o altă pirimidină (AT→GC; TA→CG; GC→AT; CG→TA)

- mutaţiile de tip transversie constau în înlocuirea unei purine cu o pirimidină şi invers (AT↔TA; AT↔CG; GC↔CG; GC↔TA).

Schimbarea succesiunii normale a nucleotidelor conduce la greşeli de împerechere în cursul proceselor de replicare, recombinare sau reparare. Deseori, greşelile de împerechere pot avea loc datorită faptului că bazele azotate se pot găsi într-o formă tautomeră, diferită de cea normală (ceto → enol sau amino → imino).

Cercetările efectuate asupra greşelilor ce apar în cursul replicării au evidenţiat faptul că acestea nu se produc la întâmplare, la nivelul moleculelor de ADN existând anumite zone predispuse la a suferi mutaţii cu o frecvenţă crescută. Aceste zone au primit denumirea de „puncte fierbinţi" („hot spots").

Consecinţa modificărilor ce apar în succesiunea normală a nucleotidelor din structura ADN poate fi modificarea cadrului de citire al mesajului genetic şi, prin urmare, a fenotipului determinat de acesta. Alteori însă, datorită caracterului degenerat al codului genetic, mutaţia rămâne fără consecinţe fenotipice.

De exemplu, atunci când substituirea unei nucleotide conduce la înlocuirea unui aminoacid cu un altul în structura proteinei (ca în cazul hemoglobinei) reprezintă o *mutaţie cu sens greşit* („missense mutation"); când substituirea unei nucleotide din genă nu determină modificări în succesiunea aminoacizilor din structura proteinei (datorită degenerării codului genetic) mutaţia se consideră a fi *„cu acelaşi sens"* („same sense mutation") sau *„mutaţie tăcută"* (*silent mutation*), iar când consecinţa mutaţiei este terminarea anormală a sintezei proteinei mutaţia este denumită *nonsens* (determină apariţia unui codon stop într-o poziţie diferită de cea normală). In anumite situaţii, deşi mutaţia determină anumite modificări în succesiunea aminoacizilor în catena polipeptidică, funcţia proteinei nu este modificată; în acest caz se spune că mutaţia este *neutră* (*neutral mutation*).

b) Mutaţiile prin deleţie presupun eliminarea uneia sau mai multor nucleotide din molecula de ADN. Cercetările efectuate asupra bacteriilor au dovedit că, prin deleţie, pot fi eliminate chiar şi gene întregi. Cu toate acestea, pentru ca bacteriile mutante să poată supravieţui este necesar ca gena eliminată să nu fie esenţială supravieţuirii.

Mutaţiile prin deleţie ocupă, ca frecvenţă, un loc important între mutaţiile spontane; de exemplu, la *E.coli* ele reprezintă aproximativ 5% din totalul mutaţiilor spontane (Snyder şi Champness, 1997). În ceea ce priveşte cauzele apariţiei deleţiilor, s-a dovedit că acestea pot fi determinate de recombinarea între diferite regiuni ale ADN. De obicei, procesul de recombinare se produce între secvenţe de ADN ce prezintă o mare omologie, fenomenul presupunând ruperea şi apoi reunirea catenelor a două molecule de ADN. Un rol special în realizarea procesului de recombinare, uneori chiar la nivelul aceleiaşi molecule de ADN, îl au secvenţele de nucleotide repetate direct. De exemplu, la bacterii, există mai multe tipuri de secvenţe repetate dintre care cele mai lungi se găsesc la nivelul secvenţelor de inserţie („insertion sequences") sau al genelor pentru ARNr. Dacă secvenţele

repetate direct se găsesc la nivelul a două molecule de ADN, atunci are loc un proces de recombinare de tip crossing over inegal; în schimb, dacă secvențele repetate se găsesc la nivelul aceleiași molecule de ADN, prin recombinare rezultă o „buclă de deleție".

Consecințele mutațiilor prin deleție sunt diverse:

- prin eliminarea unei părți a unei gene sau a genei în întregime are loc inactivarea completă a produsului codificat de aceasta
- determină uneori fuziunea unei gene cu o alta, astfel că amândouă ajung să fie controlate simultan
- determină modificarea cadrului de citire a mesajului genetic (fiind astfel mutații de tip „frameshift"), iar modificările fenotipice sunt evidente
- ele nu permit apariția de mutații de reversie, cu excepția cazurilor în care are loc inserarea corectă a secvenței lipsă.

c) Mutațiile prin inversie sunt determinate de situația în care, anumite secvențe de ADN nu sunt eliminate ci sunt reintegrate în ADN de origine în orientare inversă celei normale. Inversiile pot fi determinate de aceleași cauze ca și delețiile, cu deosebirea că, în cazul inversiilor recombinarea genetică se realizează la nivelul unor secvențe repetate inversat localizate pe aceeași moleculă de ADN.

În cazul mutațiilor prin inversare pot apărea, relativ ușor, revertanți, fenomenul fiind datorat, de obicei tot recombinării genetice. Cu toate acestea, reversia completă și exactă rămâne un eveniment destul de rar, deoarece recombinarea genetică trebuie să se realizeze exact între aceleași secvențe care au fost afectate.

d) Mutațiile prin adiție sau inserție sunt cauzate de inserarea unei nucleotide sau a unei secvențe de nucleotide la nivelul unei anumite regiuni a ADN. De cele mai multe ori, asemenea mutații se datorează integrării elementelor genetice transpozabile: transpozonilor (Tn) sau secvențelor de inserție (IS).

Integrarea unei anumite secvențe de nucleotide într-o gene determină, de obicei, inactivarea acesteia, prin modificarea cadrului de citire. Mutațiile de acest tip, produse de Tn sau IS, pot suferi reversii la tipul normal, deoarece eliminarea secvențelor integrate se realizează în mod corect.

Notația mutațiilor de inserție cuprinde denumirea genei afectate urmată de elementul genetic inserat: de exemplu, *galK*: Tn5 desemnează integrarea transpozonului Tn5 la nivelul genei *galK*.

e) Mutațiile prin duplicație reprezintă o categorie specială de mutații datorate copierii unei anumite secvențe din ADN și integrarea sa în continuarea celei inițiale (în tandem).De cele mai multe ori, regiunile duplicare sunt alcătuite din copii multiple ale aceleiași secvențe, având astfel

lungimi foarte mari. În ceea ce priveşte cauza duplicaţiilor, aceasta este, ca şi în cazul deleţiilor, recombinarea între secvenţele repetate direct de la nivelul moleculelor de ADN. S-a dovedit că, de obicei, prin recombinarea între două molecule de ADN ce conţin secvenţe de nucleotide repetate direct se produc deleţii la nivelul uneia dintre molecule şi duplicaţii la nivelul celeilalte.

Cea mai importantă proprietate a mutaţiilor prin duplicaţie este aceea că sunt foarte instabile, ele putând reveni (reverta) cu uşurinţă la tipul normal. Mutaţiile prin duplicaţie au jucat, se pare, un rol important în evoluţia materialului genetic. Astfel, de obicei, o genă nu se poate modifica fără ca funcţia sa originară să se schimbe, iar dacă respectiva funcţie este una esenţială, atunci organismul respectiv nu poate supravieţui. Totuşi, atunci când au loc duplicaţii, rezultă două copii ale aceleiaşi gene, dintre care una poate suferi la rândul ei mutaţii şi dobândi astfel funcţii noi. Aceste mecanism permite deci vieţuitoarelor de a deveni din ce în ce mai complexe prin mărirea numărului de gene şi a cantităţii de informaţie genetică.

Aşa cum s-a precizat mai sus, deleţiile, inserţiile şi chiar duplicaţiile produc modificarea cadrului de citire al mesajului genetic. Astfel, deoarece codonii sunt alcătuiţi din câte trei nucleotide, orice modificare din cele menţionate mai sus determină schimbarea compoziţiei în nucleotide a codonilor. De exemplu, dacă în succesiunea de nucleotide CAA TCC CGG ... are loc adiţia unei A, rezultă secvenţa CAA ATC CCG G... consecinţa fiind modificarea succesiunii codonilor care urmează mutaţiei. Mesajul genetic alterat este apoi transcris la ARNm şi apoi tradus astfel că secvenţa de aminoacizi din catena polipeptidică codificată de gena respectivă se modifică şi ea.

În privinţa aplicaţiilor tulpinilor microbiene mutante acestea sunt variate: de la studii fundamentale legate de clarificarea structurii şi funcţiilor anumitor gene, la aplicaţii practice legate de îmbunătăţirea particularităţilor de biosinteză ale unor compuşi biologic utili (antibiotice, enzime etc) sau la utilizarea lor drept gazdă pentru acceptarea materialului genetic exogen în experimentele de inginerie genetică. Existenţa sistemului de restricţie-modificare poate reduce semnificativ eficienţa procesului de clonare. De asemenea, pentru a putea fi selectate ulterior cu uşurinţă, tulpinile microbiene trebuie "marcate" cu un anumit caracter, uşor detectabil. Nu există un unic criteriu de clasificare a mutantelor. Cu toate acestea, în funcţie de scopul urmărit în experimentele de inginerie genetică pot fi utilizate mai multe tipuri de tulpini microbiene, naturale sau mutante, cum ar fi: sensibile/rezistente la anumite antibiotice sau la diferite metale grele; auxotrofe; capabile de a utiliza un anumit compus chimic drept substrat nutritiv etc.

Sensibilitatea/rezistenţa la antibiotice a unei tulpini bacteriene se evidenţiază fie prin realizarea antibiogramei fie prin cultivarea respectivei tulpini pe medii nutritive ce conţin un anumit antibiotic, într-o concentraţie

corespunzătoare. Cele mai utilizate antibiotice în experimentele de inginerie genetică sunt: ampicilina, kanamicina, tetraciclina, streptomicina şi cloramfenicolul. În cazul levurilor se preferă rezistenţa la unele metale grele (de exemplu, la nichel sau cadmiu).

Cele mai multe tulpini bacteriene cresc pe medii de cultură extrem de simple (minimale) care, în afara sursei de carbon (glucoză sau galactoză) nu mai conţin alte tipuri de substanţe organice. Asemenea tulpini sunt capabile să-şi sintetizeze toate tipurile de substanţe de care au nevoie pentru creştere şi dezvoltare, ele fiind desemnate ca prototrofe. Alte tulpini bacteriene necesită prezenţa în mediul de cultură a unor substanţe organice specifice (diferite de sursa de carbon), substanţe pe care nu le pot sintetiza în mod normal şi în absenţa cărora nu se pot dezvolta. Asemenea tulpini se numesc auxotrofe. De exemplu, o tulpină ce necesită ca în mediul de cultură să se găsească prolina (Pro) este considerată ca fiind auxotrofă pentru prolină şi se notează cu *pro*$^-$, în timp ce tulpina normală (de tip sălbatic) se notează *pro*$^+$.

De asemenea, există situaţii în care tulpinile bacteriene analizate sunt incapabile de a utiliza anumiţi compuşi, nesintetizând enzimele implicate în căile metabolice de degradare ale acestora. Spre exemplu, tulpinile care nu pot utiliza lactoza sau galactoza ca surse de carbon sunt notate *lac*$^-$, respectiv *gal*$^-$, în timp ce tulpinile normale (de tip sălbatic) sunt *lac*$^+$, respectiv *gal*$^+$.

O condiţie esenţială pentru reuşita unui experiment de clonare moleculară este aceea ca tulpina acceptoare să nu producă enzime de restricţie. De aceea, în asemenea experimente se folosesc, de regulă tulpini bacteriene mutante, bine caracterizate din punct de vedere genetic. Dacă însă se doreşte clonarea într-o anumită tulpină bacteriană, iar eficienţa transformării acesteia cu molecule de ADN recombinant este scăzută, se testează producerea de către aceasta a unor enzime de restricţie (prin utilizarea ADN de bacteriofag λ ca substrat de acţiune a extractului bacterian brut). În cazul în care tulpina produce asemenea enzime, ea este supusă acţiunii unor agenţi mutageni şi se selectează mutantele la care nu se mai detectează activitate restrictazică (care au devenit R$^-$).

Evidenţierea faptului că unele organisme mutante pot prezenta anumite avantaje (productivitate crescută, rezistenţă la anumiţi factori de stress etc) şi pot fi utilizate în practic a condus la examinarea posibilităţii obţinerii unor mutaţii cu frecvenţă crescută. Calea de sporire a frecvenţei de producere a mutaţiilor este aceea a utilizării unor factori mutageni variaţi (tabelul 5.2).

Tabelul 5.2

Tipuri de agenţi mutageni şi efectele utilizării acestora (după Freifelder, 1987)

Mutagenul	Modul de acţiune	Exemple	Consecinţe
Radiaţii ionizante	Generează reacţii radiochimice; determină depirimidinizarea ADN, ruperea legăturilor fosfodiesterice dintre nucleotide, ionizarea bazelor şi formarea de legături încrucişate (crosslinkage) între nucleotide	Razele Röntgen (X), raze gamma, beta, protonii, alfa, neutronii	Rupturi ale catenelor de ADN, blocarea replicării, transcrierii, restructurări cromosomale, poliploidii
Radiaţii neionizante	Generează reacţii fotochimice; absorbţia energiei fotonilor cu diferite lungimi de undă de către moleculele substratului care intră într-o stare de excitaţie, fenomenul producând reacţii chimice secundare variate în funcţie de substratul asupra căruia se exercită acţiunea şi lungimea de undă a radiaţiilor	Radiaţiile ultraviolete	Dimerizări ale bazelor pirimidinice; determină mutaţii punctiforme
Analogi ai bazelor azotate	Înlocuiesc bazele azotate normale din ADN în cursul replicării şi cauzează greşeli de împerechere	5-bromouracil 2-aminopurina	AT↔GC AT→GC
Mutageni chimici	Modifică structura chimică a bazelor azotate astfel că celulele fiice conţin secvenţe de nucleotide modificate	Acid nitros Hidroxilamină Etil metan sulfonat	GC↔AT GC→AT GC→AT;GC→CG; GC→TA
Agenţi de intercalare	Adiţia sau deleţia uneia sau mai multor perechi de baze	Acridine	Modificări ale cadrului de citire a mesajului genetic
Gene de tip „mutator"	Stimularea inserării incorectă a unor baze azotate sau absenţa procesului de reparare a adiţiilor incorecte		Se produc mutaţii punctiforme variate
Nici unul	Deaminarea spontană a 5-metilcitozinei (MeC)		GMeC→AT

O categorie importantă de **agenţi mutageni fizici** este reprezentată de radiaţii. Acestea sunt, în principal de două tipuri: ionizante şi neionizante.

Radiațiile ionizante (radiații electromagnetice - razele Röntgen sau X, raze gamma; radiații corpusculare - raze beta, protonii, raze alfa, neutronii) determină o serie de efecte care sunt dependente de doză, de tipul radiației sau de tipul de organism asupra căruia acționează, de viteza diviziunii celulare etc. La nivelul macromoleculelor de ADN ele determină: ionizarea bazelor azotate, deaminarea sau dehidroxilarea bazelor azotate și oxidarea dezoxiribozei, consecința fiind ruperea catenelor de ADN, precum și blocarea proceselor de replicare și transcriere. La doze mari au efect letal.

Radiațiile neionizante cuprind radiațiile ultraviolete (UV), cu lungimea de undă cuprinsă între 100 și 400 nm. Efectul mutagen maxim îl au radiațiile UV cu lungimea de undă de 258 nm, acestea fiind absorbite în mod preferențial de acizii nucleici. Radiațiile UV nu au proprietăți ionizante dar, în contact cu materialul genetic îi transferă acestuia energie suficientă pentru a "ridica" nucleotidele la stări excitate. Prin acest mecanism radiațiile UV pot induce tautomerizări ale bazelor azotate urmate de greșeli de împerechere. Cele mai sensibile nucleotide la acțiunea radiațiilor UV sunt cele ce conțin baze pirimidinice (timina și citozina). De aceea, efectul cel mai caracteristic al iradierii cu UV este formarea dimerilor pirimidinici (de exemplu, dimerii de timină) (figura 5.11).

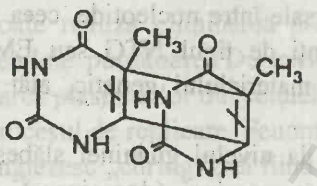


Figura 5.11. Dimer de timină format ca urmare a iradierii cu UV

Dimerizarea determină rupturi locale ale legăturilor de hidrogen, urmate de distorsiuni ale conformației normale a moleculei de ADN, astfel că procesele de replicare și transcriere sunt perturbate. Mai mult, ARNm supus iradierii cu UV poate suferi anumite modificări care împiedică realizarea corectă a procesului de traducere. În urma acestor modificări efectul poate fi letal dacă ele nu sunt corectate de către procesul reparator.

Doza de radiații utilizată și timpul de acțiune variază în funcție de specia testată, iar simplitatea echipamentului necesar și efectele obținute „in vitro" fac din iradierea cu ultraviolete principala modalitate de inducere a mutațiilor la microorganisme.

Agenții mutageni chimici grupează o gamă extrem de variată de substanțe chimice cum ar fi: analogii bazelor azotate, agenții alchilanți, substanțele de intercalare, coloranți, antibiotice, alcaloizi etc. Efectele acestor substanțe asupra materialului genetic sunt și ele diverse.

Analogii bazelor azotate sunt compuși asemănători bazelor azotate normale, astfel că în cursul procesului de replicare ei le pot înlocui

producând erori de împerechere şi deci mutaţii punctiforme. De exemplu, 5-bromouracilul (BU) este un analog al timinei care, în cursul procesului de replicare poate, pe de o parte să înlocuiască timina în perechea AT (AT→ABU) şi, pe de altă parte să se împerecheze în mod incorect cu guanina. Efecte similare 5-bromouracilului prezintă şi alte substanţe, fie analogi ai celorlalte baze azotate, fie precursori ai ADN: 5-bromodeoxiuridina, 2-oxipurina, 2-aminopurina, cafeina etc.

Agenţii alkilanţi reprezintă grupul de substanţe chimice cu efectele mutagene cele mai puternice, asemănându-se din acest punct de vedere cu radiaţiile ionizante. Din această categorie de substanţe, care au primit denumirea de substanţe radiomimetice, fac parte: iperita, etilmetansulfonatul (EMS), dimetilsulfatul (DMS), nitrosoguanidina (NTG) etc. Aceste substanţe determină introducerea unor grupări alchil în structura nucleotidelor: la nivelul atomului din poziţia 7 din structura guaninei (în majoritatea cazurilor), în poziţia 3 a adeninei şi foarte rar în poziţia 1 a adeninei. Urmarea procesului de alchilare a bazelor purinice este eroarea de împerechere a nucleotidelor: astfel guanina alchilată se împerechează cu T în loc de C. Bazele azotate pirimidinice sunt mai rezistente la acţiunea agenţilor alkilanţi, deşi EMS poate determina uneori alchilarea citozinei.

Alkilarea este însoţită de fenomene de denaturare a ADN sau de formarea unor legături încrucişate sau transversale între nucleotide, ceea ce împiedică replicarea normală. Agenţii alkilanţi de tipul NTG sau EMS prezintă o eficienţă crescută în modificarea materialului genetic, atât al celulelor procariote cât şi al celor eucariote.

De asemenea, prezenţa grupării alkil la nivelul guaninei slăbeşte legătura β-glucozidică şi determină eliminarea guaninei (depurinare), cu formarea unor breşe în structura ADN. Rezultatul final, în absenţa reparării genetice, poate fi deleţia sau incorporarea la întâmplare a unei alte nucleotide (tranziţie sau transversie).

Agenţii de intercalare sunt substanţe care, în soluţii apoase, se pot insera în ADN între bazele azotate adiacente, procesul fiind denumit intercalare. Din această categorie fac parte coloranţii acridinici de tipul acriflavinei, acridinoranjului sau proflavinei.

Intercalarea acridinelor în ADN determină alungiri ale perechilor de baze, modificarea vitezei de sedimentare şi a vâscozităţii sau chiar derulări locale ale moleculei de ADN. Atunci când o asemenea moleculă de ADN este supusă procesului de replicare, poate avea loc introducerea unor baze suplimentare în structura ADN sau chiar de deleţia anumitor nucleotide, consecinţa fiind, în ambele situaţii, modificarea cadrului de citire a mesajului genetic (figura 5.12).

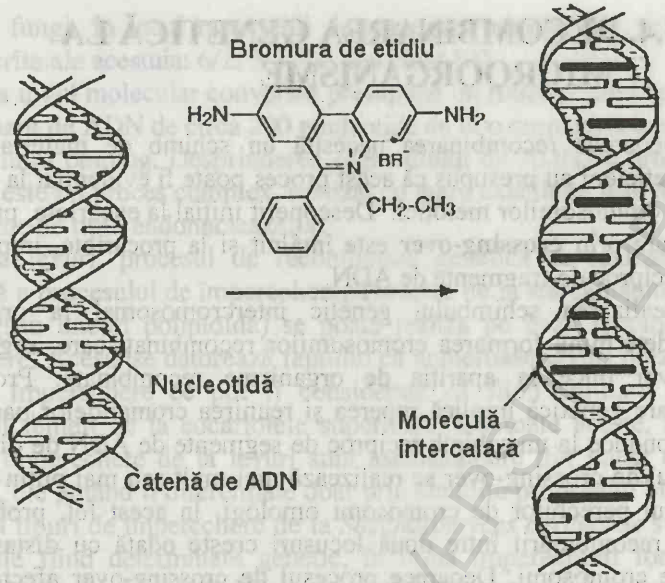


Figura 5.12. Reprezentarea schematică a modului de intercalare a bromurii de etidiu la nivelul moleculei de ADN

De asemenea, s-a dovedit că prin utilizarea coloranților acridinici se poate realiza eliminarea preferențială a anumitor molecule de ADN din celulele purtătoare. De exemplu, utilizarea acridinoranjului permite eliminarea plasmidelor din celulele bacteriene ce le conțin datorită interferenței cu procesul de replicare. Fenomenul a fost denumit „vindecare" (de la termenul englezesc „curing"), el fiind evidențiat la numeroase bacterii Gram negative (Hardy, 1981, Summers, 1996).

Alți agenți mutageni chimici. Procesul de mutageneză poate fi determinat și prin utilizarea altor agenți mutageni, cum ar fi: acidul nitros, hidroxilamina, coloranții, colchicina etc. De exemplu, acidul nitros determină deaminarea oxidativă a citozinei și adeninei, iar prin îndepărtarea unor grupări amino și înlocuirea lor cu grupări ceto rezultă uracil, respectiv hipoxantină. Ca urmare perechea GC este transformată în AT (datorită deaminării citozinei), iar perechea AT este înlocuită de perechea GC, datorită deaminării adeninei.

Hidroxilamina este unul dintre cei mai specifici agenți mutageni ce determină mutații punctiforme; ea este utilizată pentru mutageneza „in vitro" a moleculelor de ADN purificat sau asupra virusurilor deoarece nu pătrunde în interiorul celulei. Acest mutagen reacționează specific cu citozina pe care o hidroxilează. Rezultatul este, în final, o mutație de tip tranziție unidirecțională: înlocuirea perechii GC cu perechea AT.

5.4. RECOMBINAREA GENETICĂ LA MICROORGANISME

Deoarece recombinarea necesită un schimb de material genetic, mulți geneticieni au presupus că acest proces poate fi evidențiat la eucariote, la nivelul cromosomilor meiotici. Descoperit inițial la eucariote, procesul de recombinare prin **crossing-over** este întâlnit și la procariote, implicând un schimb reciproc de fragmente de ADN.

Realizarea schimbului genetic intercromosomal la organismele diploide determină formarea cromosomilor recombinați care, segregând în gameți, vor duce la apariția de organisme recombinate. Procesul de recombinare genetică implică ruperea și reunirea cromatidelor participante, ceea ce conduce la un schimb reciproc de segmente de ADN de dimensiuni. Fenomenul de crossing-over se realizează mai mult sau mai puțin randomic de-a lungul perechilor de cromosomi omologi. În acest fel, probabilitatea realizării recombinării între două locusuri crește odată cu distanța dintre aceștia pe cromosomi. Deoarece procesul de crossing-over afectează doar două dintre cromatidele bivalenților, doar 50% din produșii meiozei sunt recombinați, restul de 50% fiind de tip parental.

Studiul organismelor eucariote de tipul fungilor (de exemplu, *Neurospora crassa)* la care domină haplofaza, a dovedit că recombinarea genetică prin crossing-over se realizează și în acest caz. Astfel, prin încrucișarea dintre un individ haploid dublu mutant cu un altul normal se formează un zigot diploid heterozigot care suferă trei diviziuni succesive ce duc la formarea unei asce cu 8 ascospori haploizi. Dintre ascosporii rezultați, 50% sunt recombinați, fapt ce dovedește că între cei doi cromosmi pereche s-a produs un schimb de segmente cromatidice.

De asemenea, procesul de crossing-over se poate produce și la nivelul aceleiași gene (crossing-over intragenic), fenomen pus pentru prima dată în evidență în urma experimentelor efectuate de Benzer (1961) cu mutante de tip *rII* ale fagului T4.

In ceea ce privește mecanismul molecular al recombinării genetice de tip crossing-over, s-a dovedit că el implică participarea unor proteine specifice, procesul recombinării fiind asociat cu cel de reparare genetică. Catenele de ADN implicate în schimbul de segmente conțin secvențe la nivelul cărora au loc ruperi ale lor sub influența unei enzime specifice, ulterior intervenind și procesul de reparare, după ce s-a produs schimbul de secvențe nucleotidice.

Conversia genică este o recombinare genetică nereciprocă. Ea a fost evidențiată prin analiza tetradelor la ciupercile din genurile *Saccharomyces, Aspergillus, Neurospora* unde apar abateri de la raportul normal de segregare alelică, ca și cum se produce o transformare a alelei A în a. Frecvența recombinării genetice nereciproce poate crește de la un capăt la altul al unui locus genic, fenomen care s-a numit polarizarea conversiei.

Astfel, la fungi, în locul raportului de segregare normal 4/4 se întâlnesc valori diferite ale acestuia: 6/2, 5/3, 7/1 sau chiar 8/0.

La nivel molecular conversia presupune un transfer unidirecţional al unui segment de ADN de circa 200 nucleotide de la o cromatidă la cromatida cromozomului omolog. Desprinderea segmentului de ADN ce urmează a fi transferat este un proces complex, realizat cu mare exactitate prin intervenţia unor enzime de tipul endonucleazelor.

La levuri, procesul de recombinare genetică se realizează ca o consecinţă a procesului de împerechere. Trecerea de la starea haploidă la cea diploidă (sau uneori poliploidă) se poate realiza pe baza fenomenului de împerechere. Acesta se datorează faptului că numeroase levuri prezintă două tipuri de împerechere ce pot fi considerate ca fiind similare gameţilor masculi şi femeli de la eucariotele superioare. Cu toate aceste, cele două tipuri de împerechere de la levuri sunt asemănătoare din punct de vedere structural, ele putând fi diferenţiate doar prin anumite proprietăţi biochimice. Cele două tipuri de împerechere de la *Saccharomyces cerevisiae* sunt notate ***a*** şi ***α***, ele fiind determinate genetic, în urma împerecherii formându-se celule diploide de tip ***aα***. Celulele ce participă la procesul de împerechere secretă un hormon peptidic, denumit factor ***a*** sau ***α***. Factorii respectivi sunt capabili să recunoască şi să se lege la nivelul unor receptori specifici localizaţi la suprafaţa celulelor aparţinând tipului opus de împerechere. Astfel, celulele de tip a au la suprafaţa lor receptori doar pentru factorul de tip α în timp ce celulele de tip ***α*** au la suprafaţa lor receptori doar pentru factorul de tip ***a***. Legarea hormonilor peptidici la receptorii corespunzători determină anumite modificări ale suprafeţei celulare astfel că celulele respective fuzionează (figura 5.13)

Figura 5. 13. Aspect electronomicroscopic al procesului de împerechere de la levuri.

Deşi o linie celulară de levuri rămâne fie de tip ***a*** fie de tip ***α***, celulele haploide sunt capabile de a-şi modifica periodic tipul de împerechere, consecinţa fiind aceea că o cultură pură haploidă aparţinând unui tip de împerechere poate deveni în final diploidă.

Astfel, se cunoaşte că tipul de împerechere este determinat de o genă corespunzătoare, pentru tipul ***a*** sau pentru tipul ***α***, o celulă haploidă având câte o copie „tăcută" din ambele tipuri de gene. De asemenea, în genomul levurilor există un singur locus genetic activ notat MAT (de la cuvintele din limba engleză „mating type" = tip de împerechere) la nivelul căruia se poate

insera o copie fie a genei pentru tipul *a* fie pentru tipul *α*. La nivelul acestui situs activ se poate afla sau integra oricare dintre cele două gene pentru tipul de împerechere, promotorul MAT controlând transcrierea indiferent de tipul de genă prezentă. Astfel, dacă la nivelul locusului MAT există gena pentru tipul *α*, atunci celula manifestă tipul *α* de împerechere, iar dacă la nivelul locusului respectiv există gena *a*, atunci celula prezintă tipul de împerechere *a*. La nivelul genomului levurilor există copii ale ambelor tipuri de gene ce controlează tipul de împerechere, ele fiind însă inactive („tăcute"). Aceste copii „tăcute" reprezintă sursa pentru gena ce se va insera la nivelul locusului MAT. Procesul de împerechere se realizează în mai multe etape: mai întâi are loc aglutinarea celulelor aparţinând celor două tipuri de împerechere formându-se perechi; ulterior limitele intercelulare dispar şi are loc intermixarea citoplasmelor celulelor participante. În final are loc şi fuziunea nucleilor rezultând o celulă diploidă ce conţine informaţia genetică provenită de la ambele celule haploide implicate. Celulele diploide formate pot suferi apoi înmugurire consecinţa fiind dezvoltarea unei culturi diploide de levuri (de tip *aα*). După multiplicarea mitotică, celulele diploide pot suferi meioză, proces care conduce la formarea a două categorii de celule haploide, de tip *a* şi de tip *α*.

În condiţii naturale, informaţia genetică a bacteriilor se poate îmbogăţi prin mutageneză şi prin transferul unor noi gene de obicei de la tulpini înrudite sau, mai rar, de la specii diferite. Rata naturală a mutaţiilor este în general mică dacă este raportată la o singură genă. Ţinând însă cont de faptul că la nivelul genomului microbian există un număr considerabil de gene (de ordinul miilor), atunci se poate spune că procesul de mutageneză asigură un anumit grad de variabilitate la nivel populaţional, permiţând acestora să facă faţă modificărilor condiţiilor de mediu.

Mecanismele de transfer natural de gene la procariote sunt destul de variate, ele fiind reprezentate de transformarea genetică, conjugarea bacteriană (inclusiv sexducţia) şi transducţia, astfel că, la nivelul populaţiilor microbiene gradul de variabilitate este crescut.(figura 5.14).

Transformarea genetică a bacteriilor se referă la procesul prin care o celulă bacteriană incorporează ADN extracelular liber (cromosomal sau plasmidial), eliberat în mediul extracelular ca urmare a lizei celulare. Asemenea fragmente de ADN sunt în general de dimensiuni mari (în medie de 20.000 perechi de nucleotide), pot conţine gene utile care, pătrunse în bacteria receptoare, pot înlocui printr-un proces de recombinare o secvenţă nucleotidică omologă din genomul acesteia. Informaţia genetică nouă integrată în cromosomul bacteriei receptoare este transmisă stabil de-a lungul generaţiilor. În acest fel, transformarea genetică constituie un mecanism de transfer genetic orizontal, care depinde de funcţionarea mai multor gene localizate pe cromosomul bacterian (Brisson şi colab., 1988).

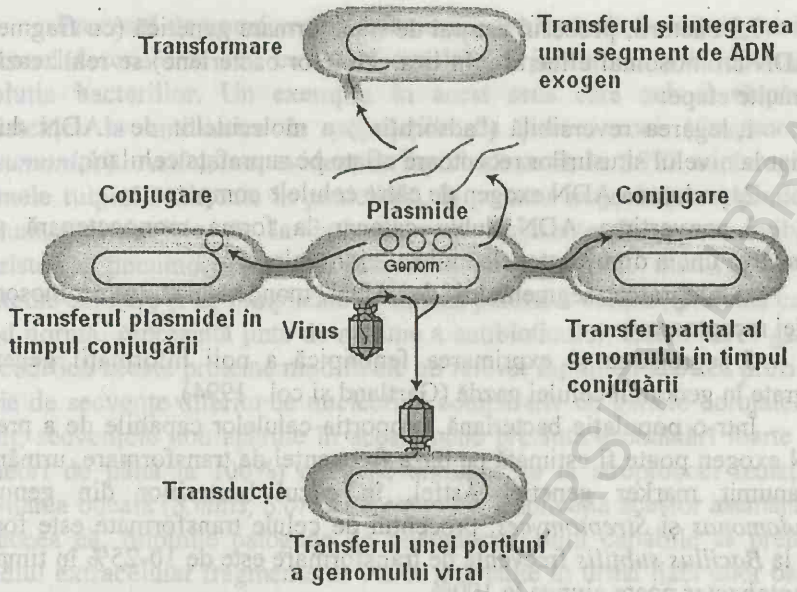


Figura 5.14. Mecanisme naturale de transfer de gene la bacterii

Fenomenul de transformare genetică a fost evidenţiat pentru prima dată la *Streptococcus pneumoniae* dar ulterior, numărul speciilor bacteriene la care acest fenomen a fost descris a crescut foarte mult: *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Pseudomonas aeruginosa, Neisseria sp., Azotobacter sp., Staphylococcus sp.*, etc.

Pentru a putea prelua ADN transformant din mediul extracelular, celulele bacteriene trebuie să manifeste o anumită stare specifică numită competenţă. La unele specii, starea de competenţă este o stare naturală, fiziologică, apărând într-o anumită etapă a ciclului de viaţă şi durând un anumit interval de timp. Spre exemplu, la *Azotobacter, Staphylococcus, Streptococcus* competenţa este maximă în tot timpul fazei de creştere logaritmică, în timp ce la alte specii, cum ar fi *Bacillus, Pseudomonas, Methylobacterium* competenţa este maximă la trecerea de la faza logaritmică la faza staţionară. S-a dovedit că în cazul bacteriilor aparţinând speciei *B.subtilis* pentru apariţia stării de competenţă este necesară o densitate celulară mare deoarece, în cursul multiplicării bacteriilor sunt eliberate în mediu numeroase peptide mici, numite *feromoni de competenţă.* Celulele devin competente doar la concentraţii mari ale acestor feromoni. Peptidele mici cu funcţii de feromoni sunt rezultatul unui proces de prelucrare proteolitică a unor peptide mai lungi codificate de gena *comX*. Se pare că feromonii bacterieni sunt implicaţi în declanşarea procesului de fosforilare a proteinei senzor Com P. În cazul altor specii, starea de competenţă poate fi indusă prin tratamente specifice (şoc de temperatură, adăugarea unor ioni etc).

La bacterii, procesul natural de transformare genetică (cu fragmente de ADN cromosomal eliberat prin liza celulelor bacteriene) se realizează în mai multe etape:

1. legarea reversibilă ("adsorbția") a moleculelor de ADN dublu catenar la nivelul situsurilor receptoare aflate pe suprafața celulară;

2. preluarea ADN exogen de către celulele competente;

3. convertirea ADN dublu catenar la forma monocatenară prin degradarea uneia dintre catenele moleculei inițiale;

4. integrarea segmentului de ADN monocatenar în cromosomul celulei receptoare;

5. segregarea și exprimarea fenotipică a noii informații genetice integrate în genomul celulei gazdă (Gartland și col., 1994).

Într-o populație bacteriană, proporția celulelor capabile de a prelua ADN exogen poate fi estimată pe baza frecvenței de transformare, urmărind un anumit marker genetic. Astfel, în cazul bacteriilor din genurile *Pseudomonas* și *Streptomyces*, procentul de celule transformate este foarte mic; la *Bacillus subtilis* frecvența de transformare este de 10-25% în timp ce la *Azotobacter* poate ajunge la 100%.

Pentru a se obține o frecvență ridicată de integrare/transformare, este necesar ca ADN cromosomal transformant să provină de la o tulpină bacteriană înrudită (ADN omolog) cu bacteriile competente acceptoare. În cazul în care este utilizat ADN heterolog (provenit de la organisme neînrudite), eficiența procesului de transformare este foarte scăzută. S-a dovedit însă că utilizarea pentru transformarea celulelor natural competente a ADN plasmidial sau fagic nu permite obținerea de celule recombinate deoarece, aceste molecule necesită realizarea circularizării pentru a se menține stabil și a se replica în celulele acceptoare. Transformarea „naturală" necesită ruperea ADN dublu catenar și degradarea uneia dintre catene astfel că doar ADN linear monocatenar poate intra în interiorul celulelor competente. Există însă exemple în care celulele bacteriene la care starea de competență este naturală au putut fost transformate de către plasmide. Cercetările efectuate în acest caz au arătat că plasmidele respective se află în stare de dimeri: în momentul transformării molecula dublu catenară circulară este linearizată, apoi una dintre catene este eliminată după care are loc replicarea și redobândirea conformației dublu catenare. În final, la nivelul moleculei de ADN plasmidial linear are loc un proces de recombinare genetică între secvențe repetate rezultând o moleculă de ADN plasmidial circular monomer.

Procesul de transformare poate contribui în mod semnificativ, prin recombinarea genetică ce se realizează la nivel individual, la mărirea variabilității genetice la nivel populațional. Astfel, multe bacterii se pot liza în mod natural, mai ales în timpul etapelor finale ale ciclului celular. In aceste condiții, ADN este eliberat în mediu de unde poate fi preluat de alte bacterii aflate în aceeași populație.

Procesul de transformare este destul de răspândit în natură, mai ales în cazul descris mai sus, cu ADN omolog, el jucând un rol important în evoluţia bacteriilor. Un exemplu în acest sens este cel al răspândirii rezistenţei la antibiotice în populaţiile de pneumococi (*Streptococcus pneumoniae*). Astfel, s-a evidenţiat faptul că dacă în 1977 se înregistrau primele tulpini rezistente la penicilină, în prezent majoritatea tulpinilor de pneumococi izolate de la bolnavi sunt rezistente la acest antibiotic. Rezistenţa pneumococilor la penicilină se datorează modificării unor proteine celulare (PLP) implicate în sinteza peretelui celular, proteine care în mod normal reprezintă ţinta de acţiune a antibioticului. Examinarea genelor ce codifică aceste proteine modificate au relevat faptul că acestea prezintă o serie de secvenţe diferite de nucleotide comparativ cu genele normale. Mai mult, secvenţele nou apărute în aceste gene prezintă asemănări foarte mari (uneori de până la 100%) cu gene similare de la streptococi izolaţi din cavitatea bucală (*S.mitis, S.oralis S.sanguis*). Explicaţia acestor asemănări ar fi aceea că, tulpinile patogene de pneumococi sunt capabile să preia din mediul extracelular fragmente de ADN provenite în urma lizei unor bacterii înrudite (streptococii din cavitatea bucală), suferind în acest fel un proces de transformare genetică în urma căruia, prin recombinare are loc modificarea genelor proprii. Această explicaţie este sprijinită de o serie de date experimentale asupra polimorfismului genelor pentru PLP de la tulpini sensibile, moderat rezistente sau înalt rezistente (Trieu-Cout şi Poyart, 1998).

Datele acumulate în ultimii ani au arătat că transferul de gene prin transformare genetică are loc nu numai pe orizontală (între bacterii înrudite) ci şi între grupe de organisme neînrudite, uneori aparţinând chiar unor genuri diferite (fenomen care explică, de exemplu, răspândirea rezistenţei la antibiotice la bacterii ca urmare a transferul genelor corespunzătoare de la bacteriile producătoare ale respectivelor substanţe inhibitori) (Acar şi Courvalin, 1998).

Transformarea in vitro a celulelor bacteriene. Numeroase tipuri de bacterii nu pot fi transformate în mod natural, adică nu pot prelua ADN din mediul extracelular. Cu toate acestea, în condiţii „in vitro" aceste bacterii pot deveni competente în urma unor tratamente cu substanţe chimice. Un exemplu în acest sens îl reprezintă *E.coli, Salmonella sp.* ca şi unele specii de *Pseudomonas*. La aceste specii, starea de competenţă poate fi indusă prin utilizarea ionilor de calciu şi a unui şoc termic (de exemplu 2 minute la 42°C), eficienţa procesului de transformare fiind însă redusă. Pentru a aprecia eficienţa procesului de transformare este necesar ca ADN transformant să conţină anumite gene selectabile (se exemplu, de rezistenţă la antibiotice), iar celulele transformate să fie cultivate pe medii selective corespunzătoare (suplimentate cu antibiotice).

Spre deosebire de celulele natural competente, bacteriile la care competenţa a fost indusă prin tratament cu ioni de calciu sunt capabile să

preia atât ADN monocatenar cât şi dublu catenar. Aceasta înseamnă că ele pot fi transformate nu numai cu ADN cromosomal linear ci şi cu ADN plasmidial circular. Aceasta particularitate a celulelor devenite competente prin tratament „in vitro" este de mare importanţă pentru experimentele de clonare moleculară sau pentru alte aplicaţii care necesită introducerea în celule a ADN plasmidial sau fagic. De remarcat faptul că atunci când se doreşte introducerea în celule a ADN viral (sau în anumite situaţii a ARN viral), procesul este numit transfecţie, rezultatul fiind producerea de particule virale (fagi progeni) ce determină apariţia de plaje de liză.

O situaţie specială apare în cazul anumitor virusuri la care simpla transfecţie a bacteriilor cu ADN viral nu conduce la multiplicarea virală. Aceasta se datorează faptului că, în condiţiile infecţiei normale, odată cu genomul viral, în celulele bacteriene este introdusă şi o ARN-polimerază virală care asigură transcrierea genelor virale timpurii. În absenţa acestei ARN-polimeraze de origine virală nu poate avea loc sinteza proteinelor virale necesare multiplicării fagului, iar în final nu se produc plaje de liză (dovada eficienţei infecţiei virale).

În cazul utilizării pentru transformarea celulelor devenite competente în mod artificial a ADN cromosomal linear, eficienţa procesului este în general mică deoarece fragmentele de ADN dublu catenar sunt degradate în interiorul celulei acceptoare de către nucleaza Rec BCD. Această nuclează atacă fragmentele de ADN de la nivelul extremităţilor, în timp ce plasmidele circulare sau ADN fagic circularizat sunt rezistente la acţiunea enzimei respective. Pentru a obţine însă o eficienţă crescută a procesului de transformare, drept celule acceptoare ale ADN exogen se utilizează mutante *recBCD*⁻ (Snyder şi Champness, 1997).

O variantă de introducere de ADN exogen în celule bacteriene este cea a **electrotransformării**. Metoda electrotransformării a fost descoperită pe baza studiilor efectuate asupra celulelor animale (hematii) supuse acţiunii câmpurilor electrice (Zimmermann, 1981-1986) şi se bazează pe fenomenul **electroporării**. Electroporarea reprezintă obţinerea unei permeabilizări reversibile a celulelor procariote sau eucariote, prin utilizarea unui câmp electric. Astfel, atunci când o celulă este expusă într-un câmp electric, componentele membranei devin polarizate iar membrana este traversată de un potenţial electric. Dacă diferenţa de potenţial depăşeşte o valoare prag, membrana se „rupe" în anumite zone, iar celula devine permeabilă pentru molecule exogene. Permeabilitatea indusă este reversibilă cu condiţia ca mărimea sau durata aplicării câmpului electric să nu depăşească o valoare critică limită, pentru că altfel celula este afectată ireversibil.

Mecanismul electroporării nu este pe deplin cunoscut. S-a stabilit experimental că diferenţa de potenţial necesară „ruperii" membranei şi formării porilor la eucariote este între 0,2-2kV/cm, porii rezultaţi având un diametru de 10 μm. La bacterii valoarea câmpului aplicat este mult mai mare: 2-25kV/cm, el variind în funcţie de specie. Diferenţele apărute depind

de o serie de factori, cum ar fi: compoziția membranei, temperatura de lucru, durata aplicării câmpului electric, specia testată (Cornea şi col., 1998).

Electrotransformarea este dependentă de mai mulți factori, cum ar fi: concentrația ADN transformant (la bacterii eficiența maximă de transformare fiind atinsă cu 1-5μg ADN/ml); dimensiunea moleculelor de ADN (moleculele mai mici au eficiență mai mare de transformare); conformația moleculară a ADN (ADN supraîncolăcit este mai eficient decât cel linear).

Primele experimente de electroporare au fost realizate pe celule animale (hematii), care sunt lipsite de perete celular. Modelul experimental utilizat pentru acestea a fost apoi aplicat şi celulelor vegetale, de drojdii sau bacteriene, dar numai după ce peretele celular a fost îndepărtat prin tratament enzimatic (deci după convertirea celulelor la protoplaşti). Cele mai multe rezultate, promițătoare de altfel, au fost obținute la plante şi la bacterii, selectându-se clone recombinate ce conțin vectori specifici. Cu toate acestea, metoda prezintă unele limitări ce țin de: sensibilitatea celulelor la tratamentul cu curent electric (a celor lipsite de perete celular); barierele de restricție ale celulelor receptoare; posibila prezență în mediul de electroporare a unor nucleaze nespecifice.

O parte dintre aceste probleme au fost rezolvate prin mai multe metode: metilarea ADN exogen, utilizarea unor molecule de ADN cu funcții de cărăuş („carrier DNA"); folosirea unor inhibitori nucleazici etc. De asemenea, în ultima vreme în experimentele de electroporare s-au folosit celule intacte, la care perete celular nu a mai fost îndepărtat.

Conjugarea reprezintă procesul de transfer unidirecțional de ADN de la o celulă donatoare la o celulă receptoare, prin intermediul unei legături intercelulare directe (pil de sex) şi condiționat de prezența în bacteria donatoare a unui element genetic specializat, denumit conjugon. Acesta poate fi reprezentat de o plasmidă cu replicare autonomă sau de un episom (capabilă de a se integra în cromosomul bacterian). Conjugarea reprezintă un fenomen larg răspândit la bacteriile Gram negative şi mai rar întâlnit la cele Gram pozitive.

Conjugarea bacteriană a fost descoperită de Lederberg şi Tatum în 1946 în urma experimentelor efectuate cu tulpini de *Escherichia coli* ce conțin sau nu o plasmidă specifică, notată F. Celulele bacteriene care conțin plasmida F (factorul F) se numesc F^+, iar cele care nu conțin această plasmidă se numesc F^-. Factorul F este alcătuit din ADN dublu catenar circular, cu o lungime de 94,5 kb şi în număr de 1-2 copii/celulă. Transferul prin conjugare al acestei plasmide se datorează prezenței unei regiuni specifice, regiunea *tra*, ce reprezintă aproximativ 30% din lungimea plasmidei F (figura 5.15).

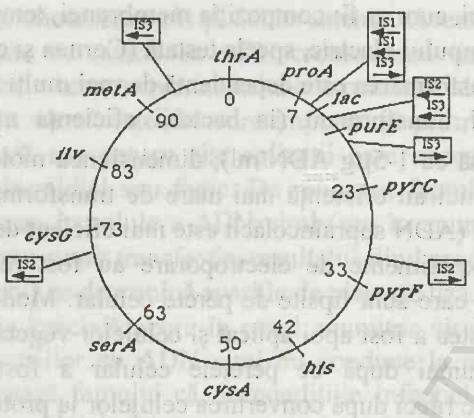


Figura 5.15. Structura plasmidei F cu evidenţierea secvenţelor de inserţie ce asigură integrarea sa în cromosomul bacterian.

Cu excepţia factorului F, celelalte plasmide conjugative pot include şi alte tipuri de gene, cum ar fi cele pentru rezistenţa la antibiotice, toleranţa la metale grele, virulenţă, patogenitate sau biodegradarea unor substanţe xenobiotice.

Conjugarea dintre celulele F^+ şi cele F^- determină transferul unei copii monocatenare a plasmidei F în celulele acceptoare (F^-), în care apoi are loc sinteza catenei lipsă. Integrarea factorului F în cromosomul bacteriei gazdă (datorită existenţei unor secvenţe de inserţie ce asigură recombinarea cu secvenţe similare din cromosom) determină formarea celulelor de tip Hfr, capabile de a realiza procesul de conjugare în urma căruia are loc transferul unui segment din ADN cromosomal în celula acceptoare (F^-), astfel că aceasta îşi poate îmbogăţi informaţia genetică.

În anumite situaţii, tulpinile Hfr au tendinţa de a redeveni F^+, prin reversia plasmidei F de la starea integrată la starea autonomă în citoplasmă (Zarnea, 1986). Excizia plasmidei F poate fi corectă sau eronată, caz în care are loc un schimb de material genetic între plasmida F şi cromosomul gazdei, prin care plasmida incorporează una sau mai multe gene cromosomale (figura 5.16). Ca urmare se formează o plasmidă F modificată, denumită F' care este capabilă de a transmite genele cromosomale integrate unei alte bacterii acceptoare, în cursul procesului de conjugare.

Transferul de gene cromosomale bacteriene mediat de plasmidele de sex este numit **sexducţie**. În urma conjugării F'x F^- se obţin doar celule de tip F' care sunt parţial "diploide" (merodiploid), conţinând alături de genele proprii şi gene similare provenite de la bacteria donoare. Transferul complet al ADN cromosomal în urma conjugării de tip Hfr – F^- necesită la *E.coli* aproximativ 90-120 minute de contact între celule (de patru ori durata ciclului celular - celula bacteriană se divide odată la 20 - 30 minute la 37°C), spre deosebire de transferul plasmidei F din bacteria F^+ într-o bacterie de tip

F care durează doar 2-3 minute. Transferul ADN are loc cu o viteză de aproximativ 5 MDa/minut. Procesul de conjugare dintre celulele de tip Hfr şi celulele de tip F servește la realizarea hărților cromosomale la bacterii, distanța dintre gene exprimându-se în unități de timp (minute).

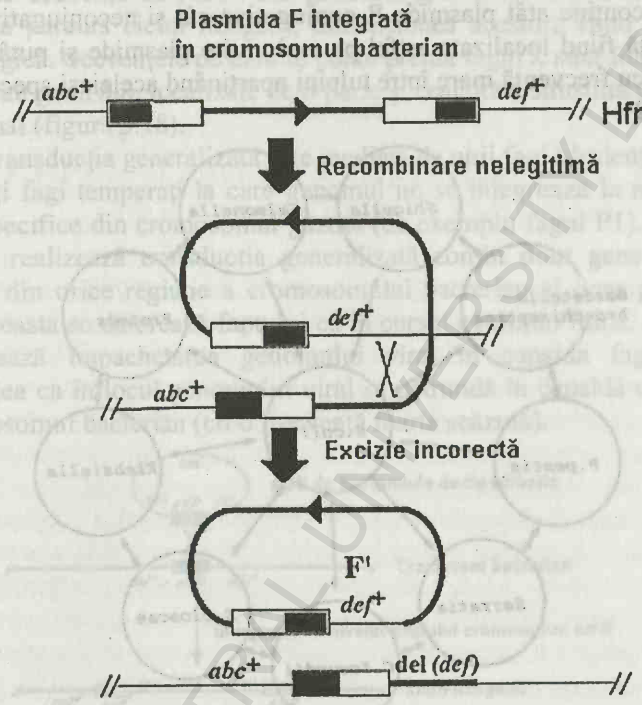


Figura 5.16. Formarea plasmidelor recombinate de tip F'

O categorie specială de plasmide conjugative sunt cele ce codifică rezistența la diferite antibiotice (plasmidele de tip R) Numeroase bacterii enterice izolate de la pacienți cu diferite infecții prezintă rezistență simultană la mai multe antibiotice, rezistența fiind mediată de plasmide R. Această rezistență multiplă este determinată de gene plasate pe una sau mai multe plasmide R, fie conjugative fie neconjugative aflate în aceeași celulă bacteriană şi care aparțin unor grupe de incompatibilitate diferite.

Plasmidele de rezistență au două trăsături importante care au contribuit atât la evoluția cât şi la răspândirea lor în populațiile bacteriene: transferabilitatea şi prezența elementelor transpozabile (figura 5.17). Transferul prin conjugare a unor plasmide R se datorează prezenței la nivelului lor a operonului *tra* similar celui descris la plasmidele F. Cu toate acestea, transferul plasmidelor R nu se poate realiza între toate tipurile de bacterii: spre exemplu, majoritatea plasmidelor R de la *Pseudomonas* nu sunt transferabile la enterobacterii în timp ce plasmidele aparținând grupului de incompatibilitate IncPI se pot replica şi menține în aproape toate speciile de bacterii Gram negative.

La multe tulpini bacteriene au fost evidenţiate şi plasmide R neconjugative dar care se pot răspândi cu rapiditate printre tulpinile bacteriene deoarece ele sunt mobilizate de alte plasmide conjugative. Aproximativ 50% dintre enterobacterii conţin plasmide conjugative ce pot mobiliza plasmide de rezistenţă neconjugative. Deseori însă, aceeaşi celulă bacteriană conţine atât plasmide R conjugative cât şi neconjugative, genele de rezistenţă fiind localizate astfel pe mai multe plasmide şi putând fi deci transferate cu frecvenţă mare între tulpini aparţinând aceleiaşi specii (Cornea şi col., 2002).

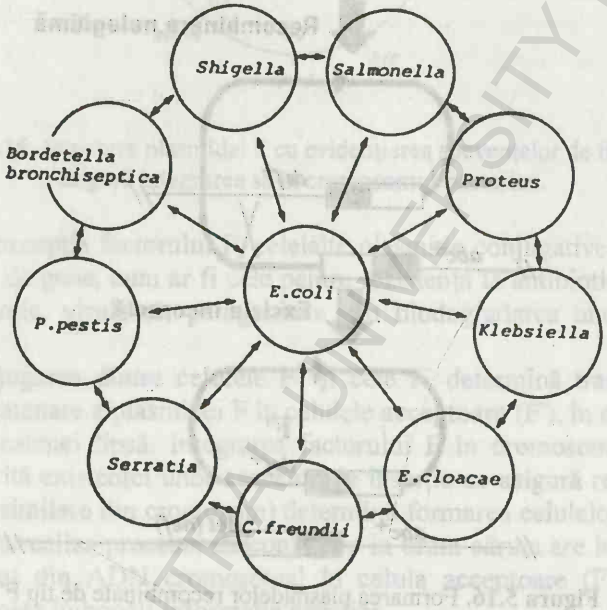


Figura 5.17. Răspândirea prin conjugare a plasmidelor de rezistenţă în cadrul grupului de enterobacterii (după Mitsuhashi şi col., 1983)

Transducţia fagică este procesul prin care un fragment din cromosomul bacterian este transferat de la o bacterie la alta prin intermediul capsidei anumitor bacteriofagi temperaţi. Fenomenul a fost descris iniţial de către Zinder şi Lederberg (1952) la bacteriofagi specifici unor tulpini de *Salmonella typhimurium,* iar ulterior el a fost mai bine studiat în cazul fagului λ, specific tulpinilor de *E.coli* (Lederberg şi Lederberg, 1953). Ulterior, în funcţie de structura genetică a fagilor transductori şi de mecanismul de formare a materialului genetic al particulei fagice, au fost descrise două tipuri de transducţie fagică: transducţie specializată şi transducţie generalizată. Bacteriofagii ce realizează transducţia generalizată produc particule ce conţin în cea mai mare parte ADN provenit din bacteria gazdă (din orice parte a cromosomului bacterian) şi doar o foarte mică parte genom fagic. În cazul fagilor ce determină transducţia specializată, ei produc

particule ce conţin atât gene fagice (majoritare) cât şi gene cromosomale bacteriene provenite dintr-o anumită regiune a cromosomului bacterian.

Cel mai cunoscut bacteriofag ce realizează transducţie specializată este fagul λ. În forma sa naturală, fagul λ poate prelua, ca fag transductor, doar scurte secvenţe de ADN din genomul gazdei în care s-a multiplicat (după ce a parcurs ciclul lizogen), dimensiunea acestora fiind limitată de capsida fagică. Secvenţele pe care le poate prelua fagul λ sunt foarte precise, gena *gal* sau gena *bio*, localizate de o parte şi cealaltă a situsului de integrare cromosomal (figura 5.18).

Transducţia generalizată este mediată de unii fagi virulenţi precum şi de anumiţi fagi temperaţi la care genomul nu se integrează la nivelul unor situsuri specifice din cromosomul gazdei (de exemplu fagul P1). Particulele fagice ce realizează transducţia generalizată conţin doar gene bacteriene provenite din orice regiune a cromosomului bacterian şi doar puţine gene virale. Aceasta se datorează faptului că în cursul evoluţiei litice, atunci când se realizează împachetarea genomului viral în capsida fagică, există posibilitatea ca în locul genomului viral să pătrundă în capsidă un fragment din cromosomul bacterian (cu o frecvenţă foarte scăzută).

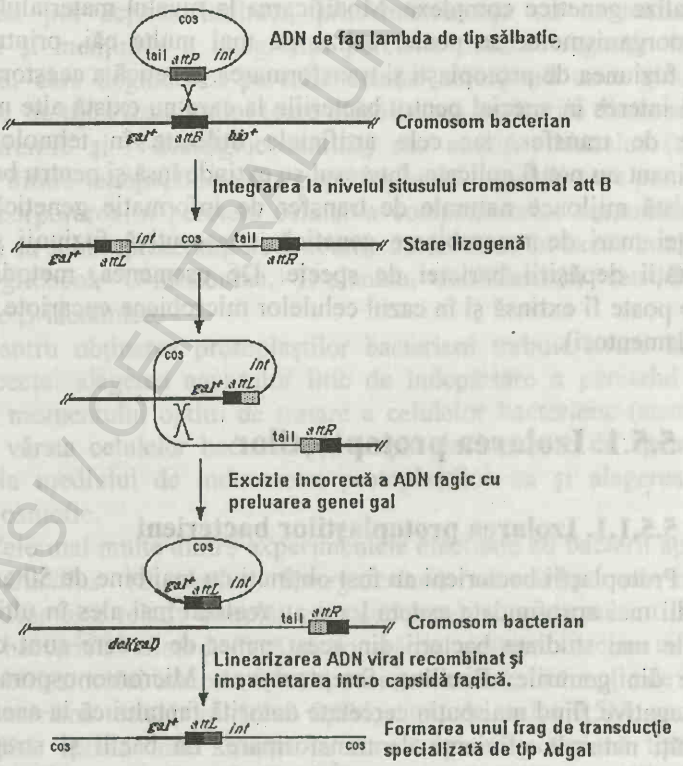


Figura 5.18. Reprezentarea schematică a procesului de transducţie specializată realizată de bacteriofagul λ

Fagii de transducţie generalizată sunt totdeauna defectivi, ei nefiind capabili de replicare şi de liză a celulei infectate. Fragmentul de ADN cromosomal introdus într-o bacterie prin intermediul fagului transductor se poate integra în genomul noii gazde prin recombinare pe bază de omologie. In anumite situaţii însă ADN transductor nu se integrează în genomul gazdei, rămâne în stare autonomă dar nu se replică. În acest fel el se "diluează" în populaţia bacteriană, fiind moştenit doar de una dintre celulele fiice, fenomenul fiind denumit "transducţie abortivă".

5.5. RECOMBINAREA GENETICĂ PRIN FUZIUNEA DE PROTOPLAŞTI

Obţinerea de microorganisme recombinate genetic, cu caracteristici productive îmbunătăţite este importantă în special pentru industria fermentativă. Studiul mecanismelor prin care se asigură modificarea caracteristicilor genetice a cunoscut în ultimii ani o diversificare crescută şi prin utilizarea protoplaştilor microbieni ca model experimental pentru realizarea unei analize genetice complexe. Modificarea la nivelul materialului genetic al microorganismelor se poate realiza pe mai multe căi, printre care se numără fuziunea de protoplaşti şi transformarea genetică a acestora. Acestea prezintă interes în special pentru bacteriile la care nu există alte mecanisme naturale de transfer, iar cele artificiale utilizate în tehnologia ADN recombinant nu pot fi aplicate. Interesul se extinde însă şi pentru bacteriile la care există mijloace naturale de transfer de informaţie genetică, datorită frecvenţei mari de recombinare genetică, consecutivă fuziunii şi datorită posibilităţii depăşirii barierei de specie. De asemenea, metoda fuziunii celulare poate fi extinsă şi în cazul celulelor microbiene eucariote (drojdii şi fungi filamentoşi).

5.5.1. Izolarea protoplaştilor

5.5.1.1. Izolarea protoplaştilor bacterieni

Protoplaştii bacterieni au fost obţinuţi cu mai bine de 50 ani în urmă dar studii mai aprofundate asupra lor s-au realizat mai ales în ultimii 15-20 ani. Cele mai studiate bacterii din acest punct de vedere sunt cele Gram pozitive din genurile: Bacillus, Streptomyces, Micromonospora etc, cele Gram negative fiind mai puţin cercetate datorită faptului că la acestea există modalităţi naturale eficiente de transformare. La bacili şi streptomicete, microorganisme ce produc o gamă largă de substanţe utile (enzime şi antibiotice), modificarea genomului lor în sensul îmbunătăţirii caracteristicilor de biosinteză a acestor substanţe este de un deosebit interes. Mai

mult, prin fuziunea protoplaştilor se pot obţine microorganisme recombinate genetic, capabile de a sintetiza substanţe biologic active „hibride".

Primele observaţii asupra protoplaştilor bacterieni au fost efectuate de către Salton (1952) care a demonstrat posibilitatea îndepărtării peretelui celular de la celule de Micrococcus lysodeikticus prin tratarea acestora cu lizozim. Protejat doar de membrana celulară, protoplastul se menţine în medii izotonice sau hipertonice ca o formaţiune aproximativ sferică, păstrând în general proprietăţile şi activităţile vitale ale celulei din care provine (capacitatea respiratorie normală, sinteza de proteine şi acizi nucleici, viabilitatea în cultură etc). Funcţia de barieră osmotică este asigurată de membrana plasmatică dar ea este mult mai labilă în lipsa protecţiei oferite de peretele celular rigid. Ca urmare, în lipsa acestuia, în medii hipotonice, protoplastul se lizează foarte rapid. Structura peretelui celular este, în general, destul de uniformă la bacteriile Gram pozitive, existând însă unele diferenţe ce se reflectă în variaţiile ce apar în metodologia de obţinere a protoplaştilor.

Protoplaştii bacterieni pot fi obţinuţi sub acţiunea unor agenţi litici variaţi, care pot exercita un efect direct asupra structurii rigide a peretelui celular sau pot acţiona indirect, prin interferenţa cu mecanismele de biosinteză şi menţinere a integrităţii peretelui celular. Agenţii de natură enzimatică, care degradează peretele celular corespund unor glucozidaze mucolitice, de tipul lizozimului (care hidrolizează legăturile dintre acidul N-acetil muramic şi N-acetilglucozamină) sau endopeptidazelor (care rup legăturile dintre tetrapeptidele din peptidoglican). Agenţii care perturbă sau inhibă incorporarea în peretele celular a componentelor raspunzătoare de rigiditatea sa sunt reprezentaţi de unii aminoacizi aflaţi în exces în mediul de cultură (glicocol, D-metionina, D-alanina, fenilalanina) sau de unele antibiotice β-lactamice.

Pentru obţinerea protoplaştilor bacterieni trebuie avute în vedere unele aspecte: alegerea agentului litic de îndepărtare a peretelui celular; stabilirea momentului optim de tratare a celulelor bacteriene (starea fiziologică şi vârsta celulelor bacteriene); timpul de incubare de agentul litic; compoziţia mediului de inducere a protoplaştilor ca şi alegerea stabilizatorului osmotic.

Cele mai multe dintre experimentele efectuate cu bacterii aparţinând genului *Bacillus* (*B.subtilis, B.megaterium*) au arătat că obţinerea protoplaştilor este relativ simplă, constând într-un tratatment cu lizozim a celulelor bacteriene aflate în fază staţionară de creştere. În ceea ce priveşte natura stabilizatorului osmotic folosit, aceasta variază, în funcţie de autor, de specia bacteriană testată: zaharoză 0,5M, citrat de sodiu 0,5M, succinat de sodiu 0,5M. Există însă situaţii în care tulpina bacteriană testată este rezistentă la acţiunea lizozimului. În aceste situaţii s-a utilizat fie un pretratament al bacteriilor cu EDTA 5mM în tampon Tris HCl 20mM, NaCl 1M pH 7,5 (în cazul unor tulpini de *B.subtilis, B.licheniformis, B.globigii*),

fie s-a înlocuit lizozimul cu un alt agent litic cum ar fi mutanolizinul în cazul tulpinilor de *B.thuringiensis*).

În urma acţiunii lizozimului asupra peretelui celular de la bacili acesta este îndepartat iar celulele dobândesc o formă aproape sferică, aşa cum o dovedesc şi analizele de microscopie electronică (figura 5.19).

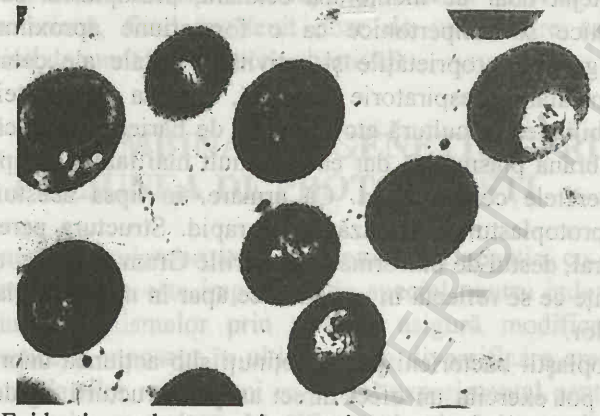


Figura 5.19. Evidenţierea electronomicroscopică a protoplaştilor de *Bacillus subtilis*

Prin importanţa practică pe care o au, ca şi prin particularităţile de creştere manifestate (creştere sub formă de miceliu), bacteriile din genul *Streptomyces* ocupă un loc special printre bacteriile Gram pozitive. În condiţii corespunzătoare de mediu (mediu de cultură agarizat), miceliul se diferenţiază în miceliu primar sau de substrat şi în miceliu secundar sau aerian, la nivelul căruia se formează sporii. În mediu lichid, miceliul este format din celule foarte heterogene în ceea ce priveşte vârsta şi starea fiziologică, ridicând unele probleme în formarea protoplaştilor. Pentru obţinerea protoplaştilor la streptomicete cei mai mulţi cercetători recurg la creşterea bacteriilor ce vor fi supuse procesului de protoplastizare într-un mediu ce conţine glicocol care, înlocuind alanina din peptidoglican, asigură o mai mare putere de acţiune lizozimului.

Realizarea unei bune protoplastizări ca şi posibilitatea de regenerare a peretelui celular la protoplaşti este influenţată de mai mulţi factori, cum ar fi: starea fiziologică, vârsta miceliului (imediat după faza exponenţială de creştere), compoziţia mediului în care se desfăşoară liza peretelui celular ca şi valoarea pH-ului acestuia, temperatura şi timpul de acţiune al enzimelor.

Aprecierea gradului de protoplastizare se poate realiza prin mai multe metode: prin cultivarea protoplaştilor pe un mediu fără stabilizator osmotic şi compararea numărului de colonii apărute pe acest mediu cu numărul de celule de la care s-au izolat protoplaştii; numărarea protoplaştilor pe lame speciale la microscop; măsurarea densităţii optice la 600 nm.

Pentru bacteriile Gram negative se apreciază că termenul de protoplast nu ar fi tocmai corect fiind, în general, preferat cel de sferoplast prin care se înţelege o celulă sensibilă osmotic, din al cărui perete celular au

rămas unele fragmente (din membrana externă)(fig. 5.20). Sferoplaştii sunt de fapt protoplaşti funcţionali deoarece ei expun zone largi ale membranei plasmatice; ei pot fi utilizaţi în fuziune sau ca acceptori de material genetic în procesul de transformare genetică.

Figura 5.20. Aspect electronomicroscopic al unor protoplaşti de *Escherichia coli.* Se remarcă la periferia celulelor prezenţa unor resturi ale peretelui celular (săgeata).

În principiu, obţinerea sferoplaştilor la bacteriile Gram negative se poate face atât prin acţiunea enzimelor ce lizează peretele celular, cât şi prin inhibarea sintezei componentelor peretelui celular. Pentru a obţine o bună protoplastizare sunt necesare mai multe condiţii: tratamentul prealabil al celulelor cu EDTA, ceea ce facilitează acţiunea lizozimului; urmează apoi aplicarea unui şoc osmotic care dirijează lizozimul prin membrana externă; condiţii specifice de temperatură; pH neutru.

În cazul bacteriilor Gram negative, utilizarea antibioticelor care interferă cu sinteza componentelor peretelui celular (penicilina, fosfomicina, carbenicilina) sau tratamentul combinat antibiotice/lizozim conduce la obţinerea unor rezultate destul de bune în procesul de protoplastizare. Obţinerea acestor celule nude este, în general, un proces cu implicaţii în domeniul ingineriei genetice, ei fiind utilizaţi pentru transformare şi fuziuni de protoplaşti.

Indiferent însă de la ce grup de bacterii se porneşte, ca urmare a unui tratament adecvat (de obicei enzimatic) apar formele celulare la care dispare peretele celular rigid, iar celula astfel obţinută ia forma sferică, în condiţii de osmolaritate corespunzătoare.

5.5.1.2. Izolarea protoplaştilor de drojdii şi de fungi filamentoşi

Primele rezultate referitoare la obţinerea protoplaştilor de drojdii (de *Saccharomyces carlsbergensis)* au fost comunicate de Eddy şi Williamson în 1957, prin utilizarea ca sursă de enzime litice a sucului digestiv de *Helix pomatia.* Ulterior, medodele de izolare a protoplaştilor s-au diversificat, ele putând fi împărţite în trei categorii majore:

- procedee mecanice sau autolitice;
- procedee de inhibare specifică a sintezei peretelui celular;

- procedee de digestie enzimatică a peretelui celular.

Cel mai folosit procedeu este cel al digestiei enzimatice, ce se poate realiza fie cu un amestec enzimatic obținut din sucul digestiv de la melc, fie cu enzime microbiene diverse (preparate enzimatice), izolate de la tulpini de *Bacillus sp., Cytophaga sp., Streptomyces sp., Penicillium purpureum, Trichoderma harzianum.* Acțiunea eficientă a sucului de melc se explică pe baza prezenței în compoziția sa a unui complex enzimatic, constituit din peste 35 enzime, cum ar fi: endoglucanaze, mananaze, chitinaze, lipaze etc. De asemenea, preparatele microbiene ce pot fi folosite pentru izolarea protoplaștilor conțin glucanaze, proteaze, chitinaza, mananaza etc. Toate aceste enzime determină liza peretelui celular al drojdiilor, constituit, în principal, din polizaharide, chitină ca și din alți constituenți. Pentru ca tratamentul enzimatic să aibă o acțiune mai mare, celulele de drojdii sunt sensibilizate prin acțiunea simultană a unor compuși cu sulf, cum sunt unii aminoacizi (cisteina) sau β-mercaptoetanolul. S-a presupus ca acești compuși acționează asupra proteinelor din structura peretelui celular prin desfacerea legăturilor disulfitice, facilitând în felul acesta acțiunea litică a enzimelor din sucul de melc.

În cazul fungilor, deoarece structura peretelui celular variază în funcție de grupul taxonomic din care organismele respective fac parte, este firesc ca și tipul de enzime litice să corespundă tipului celular. Astfel, pentru a îndeparta peretele celular la *Pythium* este esențială utilizarea celulazei și laminarinaze, în timp ce la *Schizophyllum commune* sunt necesare trei enzime: chitinaza, α 1,3-glucanaza și β-glucanaza. De remarcat că, la fel ca și la drojdii, pentru convertirea celulelor fungice la protoplaști se utilizează amestecul enzimatic existent în sucul de melc. De asemenea, deși se consideră că peretele celular al sporilor este mult mai rezistent la liză, comparativ cu miceliul, în cazul unor specii s-a reușit obținerea de protoplaști pornind de la conidii: *Neurospora crassa, Trichotecium roseum, Aspergillus flavus, Fusarium culmorum.* Deoarece protoplaștii sunt sisteme celulare fragile, pentru menținerea viabilității și integrității lor se impun condiții speciale de izolare și manipulare. Cantitatea de protoplaști izolați este influențată de vârsta și starea fiziologică a celulelor. La *Saccharomyces cerevisiae,* celulele aflate în faza exponențiala de creștere sunt imediat convertite la protoplaști, în timp ce, cele aflate în faza staționară sunt rezistente la liză (figura 5.21). Rezistența acestor celule la procesul de obținere a protoplaștilor se datorează unor modificări ce survin în structura peretelui celular.

Sensibilitatea mărită a protoplaștilor la variațiile presiunii osmotice determină asigurarea unei osmolarități echilibrate a mediului cu ajutorul unor stabilizatori specifici: glucide (sorboza, fructuza, zaharoza), polioli (manitol, sorbitol) sau diferite săruri minerale (clorura de potasiu, sulfat de magneziu, sulfat de amoniu etc).

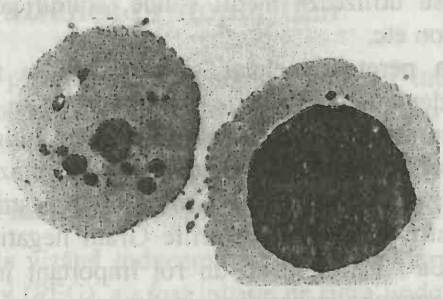


Figura 5.21. Aspect electronomicroscopic al unor protoplaşti de *Saccharomyces cerevisiae* (după Brezeanu, Anghel şi Vassu, 1988)

5.5.2. Reversia protoplaştilor

Reversia protoplaştilor reprezintă ansamblul proceselor care conduc la regenerarea peretelui celular şi revenirea protoplastului la starea de celulă iniţială, ce va putea servi la diferenţierea unui nou organism.

5.5.2.1. Regenerarea peretelui celular la bacterii

Protoplaştii bacterieni îşi pot regenera peretele celular ca urmare a unor procese metabolice de sinteză, fenomenul primind denumirea de reversie la forma vegetativă şi la aspectul caracteristic al celulei. Sinteza componentelor peretelui celular se desfăşoară prin apariţia unor componente solubile care apoi, prin reacţii de polimerizare ce se desfăşoară la periferia protoplastului determină incorporarea peptidoglicanului într-o formă insolubilă (figura 5.22).

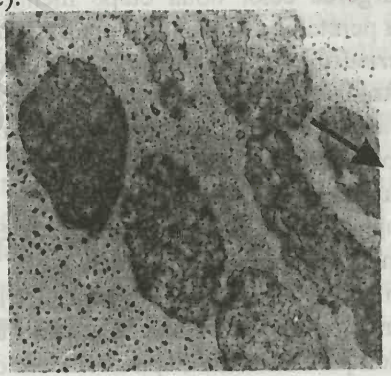


Figura 5.22. Evidenţierea electronomicroscopică a unor faze ale reversiei protoplaştilor bacterieni

Reversia protoplaştilor nu se poate realiza în mediu lichid, probabil datorită faptului că, în timpul etapei de sinteză a componentelor solubile aceştia nu pot fi menţinuţi în apropierea membranei plasmatice. De aceea,

BCU IAŞI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

pentru regenerare se utilizează medii solide, solidificarea făcându-se cu gelatină, agar, amidon etc.

Regenerarea peretelui celular şi revenirea la forma specifică a bacteriilor testate depinde de o serie de factori, cum ar fi: compoziţia mediului de regenerare, natura şi concentraţia stabilizatorului osmotic, temperatura şi timpul de incubare. În general, se apreciază că zaharoza este cel mai bun stabilizator osmotic atât pentru protoplaştii bacteriilor Gram pozitive, cât şi pentru cei de la bacteriile Gram negative. De asemenea, cationii bivalenţi (Ca^{2+} şi Mg^{2+}) au un rol important în mecanismele de sinteză a lanţurilor mucopolizaharidice, în timp ce alţi ioni (K^{+}) activează anumite sisteme enzimatice, prezenţa lor în mediile de regenerare fiind obligatorie. Condiţiile optime de regenerare variază însă nu numai în funcţie de gen sau specie ci chiar şi în funcţie de tulpina testată, ele trebuind a fi stabilite de fiecare dată. Regenerarea eficientă, prin aplicarea unei metode adcvate, reprezintă o etapă esenţială pentru experimentele de inginerie genetică, ce pot duce la obţinerea unor rezultate concludente, reproductibile.

5.5.2.2. Regenerarea peretelui celular la drojdii

Protoplaştii de drojdii şi de fungi manifestă o mare capacitate de reversie, ceea ce uşurează utilizarea lor în experimente de fuziune.

Fenomenul de reversie presupune în cazul fungilor parcurgerea a două etape: formarea unui nou perete celular şi reversia propriu-zisă în care se realizează mitoza şi citochineza, creşterea celulelor şi repetarea ciclului celular.

La drojdii, s-a constatat că procesul regenerării peretelui celular se realizează prin parcurgerea celor două etape menţionate, dar factorii ce influenţează refacerea peretelui celular la drojdii variază în funcţie de specie. La *Saccharomyces cerevisiae* regenerarea peretelui celular este posibilă doar după includerea protoplaştilor în mediu slab agarizat sau care conţine gelatină sau PEG. La alte specii cum ar fi *Schizosaccharomyces sp., Candida sp.*, regenerarea este posibilă şi în mediii lichide sau la suprafaţa mediilor de regenerare normal agarizate.

În cazul protoplaştilor de *S.cerevisiae* s-a evidenţiat ca în prima fază a regenerării se formează o reţea fibrilară alcătuită numai din glucan şi chitină cristalizată. În medii solide, componenta matriceală (manan proteinele) apare la 30-40 minute după structurarea reţelei fibrilare polizaharidice. Peretele celular este complet sintetizat după 10-14 ore de incubare în mediul solid.

După regenerarea peretelui celular, celulele eucariote încep să se dividă, multiplicându-se şi determinând formarea unor colonii pe/în mediul de regenerare. La plante, din colonii se formează calus, la nivelul căruia au loc procesele de citodiferenţiere ce vor conduce la obţinerea de plante întregi.

5.5.3. Fuziunea protoplaştilor

Fuziunea protoplaştilor presupune reunirea într-o singură celulă a genomurilor a două sau mai multe celule aparţinând sau nu unor specii diferite, în prezenţa unui agent de fuziune.

5.5.3.1. Fuziunea protoplaştilor bacterieni

Cercetările vizând inducerea fuziunii de protoplaşti, prin utilizarea polietilenglicolului (PEG), au fost iniţiate de către Fodor şi Alfoldi (1976) la *Bacillus megaterium,* de către Schaeffer şi colab.(1976) la *B.subtilis* şi de către Hopwood şi colab. (1977) la *Streptomyces sp.*, după care ele s-au extins la o gamă foarte largă de specii bacteriene (figura 5.23).

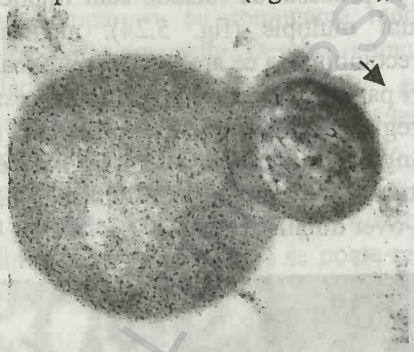


Figura 5.23. Aspect electronomicroscopic al fuziunii protoplaştilor de *Bacillus subtilis* şi *B.globigii* în prezenţa PEG.

Rolul PEG, indiferent de bacteria analizată este acelaşi: el determină aglutinarea protoplaştilor şi formarea unor agregate de dimensiuni variate. După îndepărtarea sa prin spălări succesive, agregatele disociază eliberând protoplaştii intacţi, metabolic activi, capabili de regenerare. Concentraţia, greutatea moleculară (1840, 4000, 6000, 8000) şi timpul de acţiune al PEG (în general 1-2 minute, contactul prelungit cu PEG fiind toxic pentru protoplaşti) sunt factori care influenţează randamentul de fuziune. Aceste factori variază în funcţie de tulpina bacteriană utilizată în experimente.

Selecţia produşilor de fuziune se poate face în două moduri:

- direct, prin cultivarea protoplaştilor pe mediu de regenerare selectiv;
- indirect: după regenerarea peretelui celular, realizată în condiţii neselective, coloniile apărute sunt trecute pe mediu de cultură selectiv.

Fiecare dintre cele două metode are avantajele şi dezavantajele sale. În absenţa selecţiei, pe aceeaşi placă cu mediu de regenerare se pot dezvolta atât parentalii cât şi recombinanţii, iar coloniile ce apar din celulele neprotoplastizate pot împiedica dezvoltarea recombinanţilor prin fenomenul de autoinhibiţie. În cazul metodei selecţiei directe, dezavantajul principal

este acela al subestimării frecvenței de recombinare, deoarece nu toate tipurile de celule recombinate apar pe mediul de regenerare selectiv utilizat.

În urma fuziunii, cel puțin temporar, produșii rezultați sunt „diploizi", conținând în aceeași celulă ambele genomuri parentale („biparentali"). Ulterior, au loc o serie de evenimente genetice în urma cărora se formează recombinanții. Ceea ce este important pentru biparentali este faptul că, deși conțin ambele genomuri parentale, ei manifestă un singur fenotip, al uneia dintre formele parentale. Biparentalii, ce reprezintă aproximativ 10% dintre coloniile aparute în urma fuziunii, pot fi considerați, într-un anume sens, ca „heterodiploizi" deoarece ei se pot propagă sub această formă, segregă și recombină. Prin segregarea biparentalilor apar parentalii, diverse celule recombinate și „biparentalii diploizi".

În general, în procesul de fuziune sunt implicate mai multe celule, realizându-se fuziuni multiple (fig. 5.24), analiza genetică ulterioară indicând faptul că recombinarea ce are loc se poate realizează între două sau mai multe genomuri parentale. De asemenea, în procesul de recombinare pot fi implicate toate regiunile cromosomului bacterian, având loc numeroase fenomene de crossing-over. Astfel, aproximativ 25% dintre celulele recombinate ar fi rezultatul unor crossing-overe multiple, în timp ce 75% se pot forma prin crossing-over dublu.

Figura 5.24. Evidențierea procesului de fuziune multiplă a protoplaștilor de la bacterii din genul *Streptomyces* (săgeata)

Rezultatele obținute în urma fuziunii protoplaștilor bacterieni permit unele concluzii cu caracter general:

- orice protoplast poate fuziona cu altul neexistând bariere genetice sau incompatibilitate la acest nivel;
- polaritatea evidențiată în cazul conjugării nu joacă nici un rol în fuziunea indusă de PEG a protoplaștilor;
- la toate speciile testate în urma fuziunii protoplaștilor au fost obținute celule recombinate chiar dacă frecvența a fost diferită;
- în formarea recombinanților tulpinile parentale par a juca un rol egal;

- tehnica fuziunii de protoplaşti poate fi utilizată cu succes pentru analiza genetică la bacterii la care nici un alt sistem natural nu o permite.

De cele mai multe ori, experimentele de fuziune a protoplaştilor au fost realizate prin utilizarea a două tulpini aparţinând aceleiaşi specii (fuziune întraspecifică), dar care se deosebeau prin diferiţi markeri genetici (rezistenţa la antibiotice sau necesităţi nutriţionale diferite (tulpini auxotrofe). Fuziunea intraspecifică prin utilizarea tulpinilor auxotrofe a permis elaborarea sau verificarea hărţilor genetice ale unor specii bacteriene aparţinând genurilor: *Bacillus, Streptomyces, Nocardia,Providencia, Staphylococcus, Escherichia, Brevibacterium* etc.

Frecvenţa mare de crossing-over ce apare în urma fuziunii intraspecifice a protoplaştilor, comparativ cu conjugarea mediată de plasmide, permite cartarea genelor foarte apropiate. Deseori, atunci când fuziunea de protoplaşti este utilizată pentru obţinerea unor genotipuri noi de microorganisme industriale este necesar să se selecteze numai anumite tulpini recombinate, derivate de la una dintre tulpinile parentale. În acest sens, s-au realizat experimente interesante la *Bacillus* şi *Streptomyces*, prin utilizarea în fuziune a protoplaştilor inactivaţi sau chiar omorâţi. Inactivarea protoplaştilor uneia dintre tulpinile parentale se poate realiza prin folosirea unor substanţe chimice, a căldurii sau prin iradiere cu UV (în doză puternică).

Fuziunea protoplaştilor s-a dovedit a fi o metodă foarte utilă pentru obţinerea unor tulpini recombinate rezultate prin încrucişării interspecifice sau chiar intergenerice. Prin compararea frecvenţei de apariţie a coloniilor recombinate în urma procesului de conjugare şi cea prin fuziune de protoplaşti între două specii de *Streptomyces* (*S.bikinensis x S.fradiae*), s-a evidenţiat că eficienţa recombinării este de 10-100 ori mai mare în cazul fuziunii.

În cazul fuziunii interspecifice, marcarea tulpinilor este obligatorie sau poate fi înlocuită prin inactivarea unuia dintre parteneri. De obicei, frecvenţa de fuziune/recombinare în cazul fuziunii între protoplaşti izolaţi de la bacterii aparţinând unor specii diferite este mică, în principal obţinându-se „biparentali" care segrega uşor formând tulpinile parentale. În plus, este posibil ca eficienţa scăzută a recombinării în cazul fuziunii interspecifice să se datoreze şi existenţei unui puternic sistem restrictazic la tulpinile respective.

Fuziunea interspecifică este de mare interes în cazul streptomicetelor, ea putând duce la obţinerea unor tulpini recombinate genetic capabile de a sintetiza metaboliţi noi (antibiotice „hibride", de pildă).

O variantă a fuziunii protoplaştilor este electrofuziunea. Acesta utilizează forţele de acţiune ale unui câmp electric neuniform ce determină aderarea celulelor adiacente, urmată de o dezorganizare reversibilă a

membranei plasmatice şi o creştere puternică a permeabilităţii acesteia. În comparaţie cu metoda chimică de fuziune, electrofuziunea asigură o fuzionare mai rapidă în condiţii fiziologice celulare apropiate de normal, iar fuziunile au loc cu o frecvenţă mai ridicată. Celulele fuzionate prin această metodă îşi păstrează nealterată capacitatea de regenerare a peretelui celular şi de înmulţire (diviziune celulară).

Protoplaştii obţinuţi prin procedeele descrise anterior constituie, în acelaşi timp, şi sisteme la care se poate induce transformarea sau transfecţia cu ADN exogen. Asemenea experienţe s-au efectuat mai ales la bacterii la care nu se poate realiza starea de competenţă (naturală sau indusă). Pentru a realiza aceste procese se utilizează ca agent inductor PEG, frecvenţa de transformare, respectiv transfecţie (cu ADN viral) fiind considerabil influenţată de sistemele de restricţie/modificare ale celulei ca şi de prezenţa unor DN-aze în mediul de cultură al protoplaştilor.

5.5.3.2. Fuziunea protoplaştilor de la drojdii şi fungi

Protoplaştii de drojdii pot fi utilizaţi pentru realizarea procesului de fuziune în prezenţa PEG, descendenţa hibrizilor fuzionaţi putând fi caracterizaţi pe baza complementarităţii markerilor de auxotrofie sau de rezistenţă la diferite substanţe (inclusiv metale grele cum ar fi Ni şi Co). Descendenţa produşilor de fuziune poate fi caracterizată pentru confirmarea originii hibride prin: sporulare şi segregare mitotică sau segregare meiotică, stabilirea fuziunii nucleare - formarea de heterocarioni sau homocarioni, stabilirea gradului de ploidie (analiză tetradică) (Morgan, 1983). Interesul deosebit pentru obţinerea unor produşi de fuziune este datorat faptului că multe drojdii au importanţă industrială deosebită şi, prin urmare, ele pot fi ameliorate prin această metodă. Printre caracteristicile ce pot fi îmbunătăţite prin fuziunea protoplaştilor se numără: utilizarea glucidelor, producerea şi toleranţa faţă de alcool, producerea aromelor, rata de fermentaţie şi stabilitatea genetică.

În cazul fungilor, s-a observat că poate să apară fuziunea spontană a protoplaştilor, cu o frecvenţă foarte mică. Adăugarea în suspensia de protoplaşti a PEG (25-30%) şi ionilor de Ca^{2+} ($CaCl_2$10mM) determină o creştere a frecvenţei de agregare a protoplaştilor şi apoi de fuziune a lor. De obicei, pentru fuziune sunt utilizaţi protoplaşti izolaţi de la tulpini auxotrofe (*Aspergillus nidulans*), obţinându-se miceliu heterocariotic. Acesta poate fi menţinut pe mediu selectiv (minimal), condiţii care elimină segreganţii auxotrofi. Cu toate acestea, în cursul formării conidiilor pornind de la miceliul heterocariotic se realizează, de obicei, segregarea (reapariţia de celule auxotrofe) şi doar foarte rar se produce recombinarea genetică (în cursul cariogamiei)(Scriban, 1993) Cu toate acestea, prin optimizarea condiţiilor de fuziune, se pot obţine rezultate promiţătoare, mai ales în cazul tulpinilor fungice producătoare de antibiotice sau enzime.

6. TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT – ETAPE, APLICAȚII

Biotehnologia moleculară reprezintă un domeniu incitant bazat pe capacitatea cercetătorilor de a transfera material genetic de la un organism la altul. Acest transfer de gene se bazează pe tehnicile de inginerie genetică (tehnologia ADN recombinant). Cunoștințele dobândite până în prezent în domeniul geneticii moleculare, asamblate în mod meticulos, au făcut posibilă dezvoltarea unor procedee sofisticate ce permit izolarea, transferul și exprimarea materialului genetic de interes, între organisme fără legături filogenetice.

Tehnologia ADN recombinant se referă la metodologia obținerii moleculelor de ADN recombinant, adică de realizare "in vitro" a unor molecule de ADN, noi prin îmbinarea de fragmente provenite fie din genomul unor specii biologice diferite, fie de la aceeași specie. Reunirea fragmentelor de interes se realizează într-o ordine diferită de cea naturală, astfel încât elementele genetice utilizate capătă o structură aparte, ceea ce conferă organismului în care sunt introduse proprietăți noi, pe care nu le-ar dobândi pe cale naturală. Pentru a obține moleculele de ADN recombinant este necesar să se parcurgă mai multe etape, care pot fi sintetizate astfel:

1. izolarea genelor naturale sau sinteza chimică a unor molecule de ADN ce codifică proteinele dorite;
2. selecția unui vehicul sau vector adecvat care să transporte genele respective și apt să se replice autonom în celula receptoare;
3. inserția genelor străine în structura genetică a moleculei vector și obținerea unei himere moleculare;
4. introducerea acesteia într-o celulă bacteriană și transformarea ei;
5. asigurarea condițiilor care permit exprimarea informației străine în celula gazdă;
6. selecția celulelor modificate genetic din populația celulară rezultată prin multiplicare;
7. evidențierea produsului genei în celulele modificate sau în mediul de cultură al acestora și purificarea lui pentru a fi folosit în scopurile pentru care s-au realizat tehnicile respective.

Realizarea acestor tipuri de experimente presupune cunoaşterea proceselor genetice fundamentale (replicare, transcriere, traducere, reglaj genetic, recombinare genetică etc) specifice pentru fiecare categorie de material biologic utilizat în experimente şi corelarea acestor cunoştinţe cu diferite aspecte practice, tehnice.

Sursele de material genetic ca şi gazdele în care se poate face transferul acestuia sunt foarte variate: bacterii, fungi, celule vegetale şi celule animale aflate în cultură, diverse tipuri de virusuri (ale bacteriilor, fungilor, insectelor, plantelor sau animalelor) ca şi organisme pluricelulare (plante, peşti, şoareci, animale domestice etc).

6.1. SISTEME BIOLOGICE UTILIZATE ÎN TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT

Aşa cum se cunoaşte, organismele vii sunt grupate în două grupe principale: procariote (PK) şi eucariote (EK). Diferenţele dintre cele două categorii se referă în principal la prezenţa sau absenţa unui nucleu adevărat, la organizarea materialului genetic în cromosomi, la caracteristicile peretelui celular, la prezenţa sau absenţa unor organite citoplasmatice specifice şi, nu în ultimul rând la procese metabolice specifice. In cazul celulelor procariote, ADN cromosomal se află în contact direct cu citoplasma datorită absenţei membranei plasmatice, peretele celular conţine în principal peptidoglican, dar nu şi chitină sau celuloză, iar la nivelul citoplasmei, cu excepţia ribosomilor, nu există organite celulare specifice. Celulele eucariote prezintă o compartimentare celulară evidentă, ADN cromosomal fiind localizat la nivelul nucleului delimitat de citoplasmă prin membrana nucleară; peretele celular, dacă există, conţine chitină sau celuloză, nu şi peptidoglican, iar în citoplasmă se găsesc organite specifice (mitocondrii, aparat Golgi, reticul endoplasmic, cloroplaste, lizozomi etc).

Alegerea sursei de material genetic ca şi a gazdei în care se va face transferul (bacterie sau celulă eucariotă) depinde de scopul experimentului şi de condiţiile de experimentare. Cele mai utilizate gazde în experimentele de inginerie genetică sunt *Escherichia coli* şi *Saccharomyces cerevisiae,* deşi în ultimii ani gama sistemelor gazdă s-a extins foarte mult odată cu progresele legate de „construirea" de vectori eficienţi şi de stabilirea unor metode eficiente de introducere şi exprimare a genelor de interes în alte organisme.

O întrebare firească se pune: de ce *E.coli*? Răspunsul este destul de simplu: pentru că, de-a lungul ultimilor 50 de ani această bacterie, care se găseşte în mod normal printre microorganismele ce populează suprafaţa intestinului uman, a fost supusă unor cercetări intense, constituind model experimental pentru genetica moleculară, microbiologie sau biochimie (figura 6.1). De aceea a fost posibilă acumularea de informaţii detaliate legate de particularităţile morfologice, de cultură, biochimice şi genetice ale acestei bacterii. Să nu uităm că procesul de recombinare genetică a fost descoperit în urma cercetărilor efectuate asupra

tulpinilor de *E.coli*, ca de altfel și primele plasmide (factorul F), procesul de replicare semiconservativă, reglarea genetică a activității celulare (modelul operonului) sau procesul de restricție modificare.

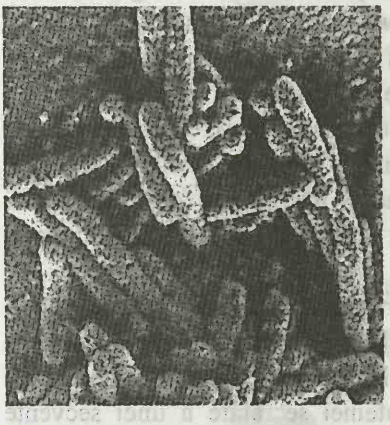


Figura 6.1. Aspect electronomicroscopic al celulelor de *E.coli* (după Zarnea, 1981)

Pornind de la aceste cunoștințe de bază, suplimentate de faptul că cele mai multe rezultate legate de plasmide, de enzimele de restricție sau de alte categorii de enzime au fost obținute tot la această specie, cercetătorii au considerat că există suficiente argumente pentru a o supune experimentelor de transfer controlat de gene de interes (Cornea, 2002).

Avantajele utilizării *E.coli* în experimentele de inginerie genetică sunt următoarele:

- prezintă o rată mare de multiplicare comparativ cu alte categorii de organisme ceea ce permite obținerea unor cantități mari din produsul de interes într-un timp relativ scurt;
- au fost izolate numeroase categorii de mutante utilizabile drept gazde pentru clonare (care permit o selecție rapidă a clonelor recombinate);
- nu prezintă cerințe nutriționale deosebite fiind, de obicei, un organism fără pretenții nutriționale deosebite;
- pentru transformarea celulelor cu ADN de interes au fost elaborate o serie de metode simple și rapide (transformarea celulelor competente după tratament cu $CaCl_2$ sau electrotransformarea);
- majoritatea vectorilor de clonare, inclusiv cei de exprimare au fost elaborați pentru această bacterie, fapt ce a permis transferul și deseori exprimarea unor categorii variate de gene;
- există metode rapide și eficiente de selecție și analiză a clonelor recombinate;
- există experiență biotehnologică cu această bacterie (cultivarea la nivel de bioreactor, optimizarea proceselor fermentative de interes, prelucrarea biomasei celulare obținute, extracția și purificarea compușilor sintetizați etc).

Diversificarea cercetărilor de inginerie genetică a condus la realizarea de experimente de transfer de gene utilizând şi alte **bacterii Gram negative** decât *E.coli*, care să poată fi utilizate ulterior în diferite procese biotehnologice. Acesta este cazul bacteriilor din genurile *Pseudomonas* (grup ce cuprinde tulpini bacteriene implicate în degradarea unor compuşi poluanţi, inclusiv a unor hidrocarburi), *Thiobacillus* (cuprinde bacterii capabile să acumuleze anumite metale), *Agrobacterium* (cuprinde specii fitopatogene capabile să transfere în mod natural anumite secvenţe de nucleotide de origine bacteriană în genomul plantelor infectate prin intermediul unei plasmide de dimensiuni mari), *Rhizobium* (cuprinde specii capabile să realizeze simbioze cu diferite plante leguminoase şi să fixeze azotul atmosferic) etc.

Folosirea unui anumit tip de bacterie Gram negativă drept gazdă pentru transferul de gene heterologe depinde şi de posibilitatea secreţiei compusului de interes în mediul extern. Diferenţa dintre proteinele citoplasmatice şi cele secretate constă în existenţa la extremitatea amino a proteinei secretate a unei secvenţe specifice de aminoacizi (secvenţă semnal, peptid semnal, secvenţă leader, peptid leader). Experimentele efectuate în ultimii ani au evidenţiat faptul că bacteriile Gram negative prezintă o serie de căi diferite de secreţie a unor proteine variate (Glick şi Pasternak, 2003). Unele dintre aceste sisteme de secreţie (căile Sec-dependente) utilizează acelaşi complex proteic de tip Sec, legat la membrană şi asigură transferul proteinei secretate prin membrana plasmatică spre spaţiul periplasmic. Aceste căi de secreţie au fost desemnate drept căi generale (GSP = „general secretion pathway") mecanismul fiind, pe scurt, următorul: proteina citoplasmatică SecB leagă proteina de secretat la un peptid semnal. De asemenea, proteina SecB se combină cu proteina SecA din complexul Sec legat la membrană. Proteina de secretat este translocată prin membrană în spaţiul periplasmic, iar peptidul semnal este îndepărtat prin intervenţia unei peptidaze specifice. La nivelul spaţiului periplasmic proteina secretată interacţionează cu diferite alte proteine periplasmice care îi determină împachetarea corespunzătoare. In continuare, proteina secretată traversează şi membrana externă pe diferite căi: printr-un canal transmembranar format chiar de proteina secretată; prin canale membranare formate prin intervenţia unor proteine diferite; prin intermediul unui complex proteic notat Gsp care traversează spaţiul periplasmic (figura 6.2).

De asemenea, particularităţile unor grupe de **bacterii Gram pozitive** au determinat utilizarea acestora în experimentele de inginerie genetică. In acest grup important de microorganisme sunt cuprinse bacterii cu importanţă industrială deosebită, cum ar fi: *Bacillus subtilis*, *B.licheniformis*, *B.amyloliquefaciens*, diferite specii de bacterii lactice (genurile *Lactococcus* şi *Lactobacillus*), bacteriile din genul *Streptomyces* etc.

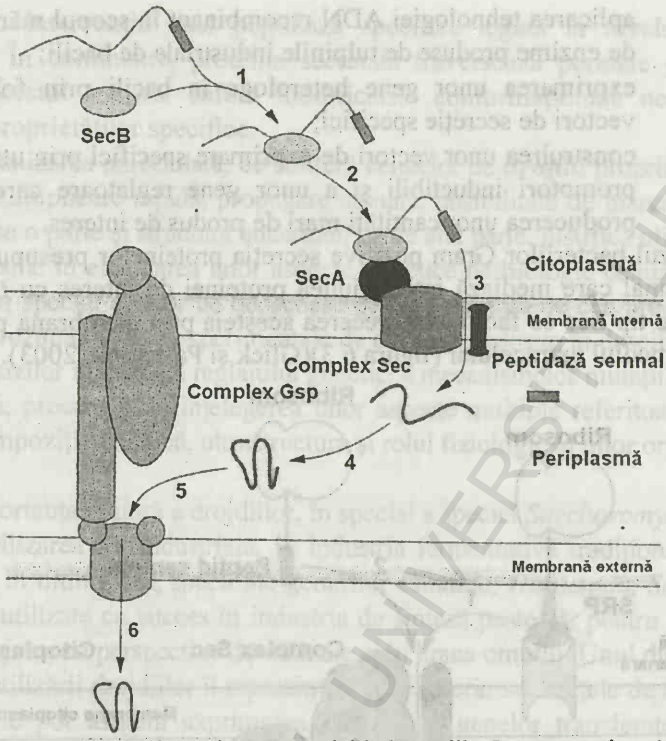


Figura 6.2. Reprezentarea schematică a secreției la bacteriile Gram negative. 1- Proteina SecB se atașează la o proteină secretoare din citoplasmă; 2 – Ansamblul format se leagă la proteina SecA ce face parte din complexul Sec localizat la nivelul membranei interne; 3 – Proteina secretoare este translocată prin membrana internă; 4 – O petidază semnal îndepărtează peptidul semnal iar proteina secretoare este împachetată corespunzător în citoplasmă; 5 – Proteina secretoare se combină cu complexul Gsp și este translocată în mediul extern (6) (după Glick și Pasternak, 2003)

Dintre bacteriile din genul *Bacillus*, cele mai multe experimente au fost realizate cu *B.subtilis*. *B.subtilis* este o specie nepatogenă și destul de bine caracterizată din punct de vedere genetic, ea fiind cunoscută ca producător a unei game largi de enzime extracelulare utile din punct de vedere practic: amilaze, proteaze, glucanaze etc. Enzimele respective se obțin la scară industrială prin cultivarea bacteriilor în medii adecvate, existând o bună experiență tehnologică în această direcție. Prin semnificația teoretică și practică a acestor bacterii, ele pot fi utilizate drept model experimental în scopul obținerii de informații legate de construirea de vectori de clonare, de modalitățile de transfer și exprimare a unor gene.

Cercetările efectuate asupra utilizării bacteriilor din genul *Bacillus* în ingineria genetică pot fi grupate în mai multe direcții:

- clonarea genelor ce codifică producerea unor enzime extracelulare importante, izolate de la diferite specii de bacili;

- aplicarea tehnologiei ADN recombinant în scopul măririi cantității de enzime produse de tulpinile industriale de bacili;
- exprimarea unor gene heterologe în bacili prin folosirea unor vectori de secreție specifici;
- construirea unor vectori de exprimare specifici prin utilizarea unor promotori inductibili și a unor gene reglatoare care să asigure producerea unor cantități mari de produs de interes.

În cazul bacteriilor Gram pozitive secreția proteinelor presupune existența secvenței semnal care mediază interacțiunea proteinei de interes cu un complexe membranar de tip Sec ce facilitează trecerea acesteia prin membrana plasmatică și eliberarea în mediul extracelular (figura 6.3)(Glick și Pasternak, 2003).

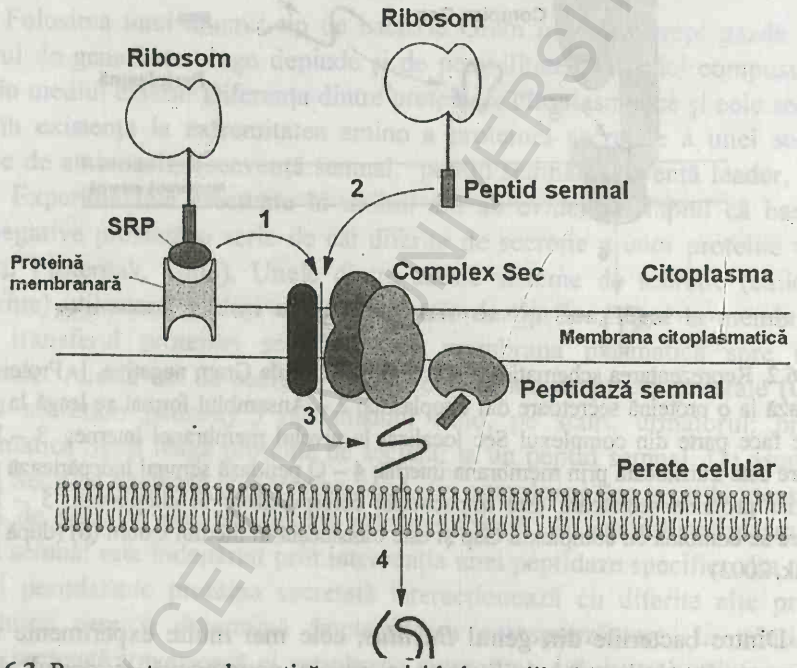


Figura 6.3. Reprezentarea schematică a secreției la bacteriile Gram pozitive. Complexul de recunoaștere a peptidului semnal (SRP) se leagă de secvența semnal a proteinei secretoare iar ansamblul rezultat se atașează la o proteină membranară care o dirijează spre complexul Sec (1). Există și o cale de secreție independentă de SRP în care peptidul semnal mediază direct contactul cu complexul Sec (2). Proteina secretoare este translocată printr-un canal de la nivelul complexului Sec iar peptidul semnal este îndepărtat de către o peptidază specifică (3). Impachetarea corectă a proteinei secretoare se realizează în timpul traversării peretelui celular (4) (după Glick și Pasternak, 2003)

În anumite cazuri, la nivelul secvenței semnal a proteinei de secretat se leagă un complex proteic ce recunoaște secvența semnal și împreună interacționează cu un receptor membranar specific înainte de contactul cu complexul Sec. In ambele situații proteina de interes este translocată printr-un canal format de complexul Sec iar eliberarea sa depinde de îndepărtarea proteinei

semnal prin intervenția unei peptidaze specifice legată la nivelul membranei plasmatice. În continuare, proteina secretată traversează peretele celular iar pe parcursul acestui transfer suferă modificările conformaționale necesare pentru conferirea proprietăților specifice.

Organizarea unicelulară, ce conferă celulelor de **drojdii** proprietăți cum ar fi: creştere şi multiplicare rapidă, propagare clonală, posibilitate de marcare selectivă şi analiză, pe de o parte şi structura eucariotă, pe de altă parte, justifică utilizarea acestor microorganisme în elucidarea unor aspecte teoretice de biologie celulară, genetică şi biochimie, în special a celor ce deosebesc celula eucariotă de cea procariotă. Astfel, drojdiile reprezintă modele experimentale de excepție, folosite în descifrarea structurii şi sintezei acizilor nucleici, a reglajului genetic, a mecanismelor mutațiilor, reparării şi recombinării, precum şi în înțelegerea unor aspecte multiple referitoare la originea, evoluția, compoziția chimică, ultrastructura şi rolul fiziologic al unor organite celulare la eucariote.

Importanța majoră a drojdiilor, în special a speciei *Saccharomyces cerevisiae,* constă în utilizarea lor industrială, în industria fermentativă tradițională (bere, vin, panificație). In ultimii ani, specii ale genurilor *Candida, Hansenula, Saccharomyces, Pichia* sunt utilizate cu succes în industria de sinteză proteică, pentru producerea de proteine furajere, cu perspective de utilizare şi în hrana omului. Unul dintre avantajele majore ale utilizării drojdiilor îl reprezintă faptul că prin secvențele de reglare pe care le posedă ele pot asigura exprimarea eficientă a genelor transferate (transcrierea corectă, prelucrarea posttranscripțională a ARNm, sinteza proteinelor de interes şi prelucrarea posttranslațională a acestora). Deoarece drojdiile secretă un număr redus de proteine în mediul de cultură (mai puțin de 0,5%), prin eliberarea proteinelor heterologe se poate obține un grad mare de puritate al acestora astfel că nu sunt necesare tehnici complicate de purificare.

Secreția proteinelor în cazul drojdiilor este asemănătoare celei din celulele vegetale sau animale. Pe scurt, secvența semnal este ataşată proteinei secretate în timpul procesului de sinteză al proteinelor prin intervenția unei particule de recunoaştere a semnalului (SRP = „signal recognition particle"). SRP se ataşează la nivelul unui receptor localizat la nivelul membranei reticulului endoplasmic, iar proteina secretoare trece în lumenul reticulului endoplasmic pe măsură ce procesul de traducere se desfăşoară. In cursul acestui proces de translocare peptidul semnal (secvența semnal) este eliminat prin intervenția unei peptidaze. La nivelul reticulului endoplasmic proteina secretată este împachetată şi, dacă este nevoie, glicozilată iar în final, este inclusă în interiorul unei vezicule care părăseşte reticulul (printr-un proces de „înmugurire") şi fuzionează cu componente ale aparatului Golgi (figura 6.4) (Glick şi Pasternak, 2003). La nivelul aparatului Golgi proteina secretată suferă prelucrări posttranslaționale suplimentare după care este fie eliminată în spațiul extracelular (secreție constitutivă), fie este menținută la nivel citoplasmatic, în vezicule situate în apropierea membranei plasmatice de unde va fi eliberată în exteriorul celulei, după declanşarea unor semnale specifice.

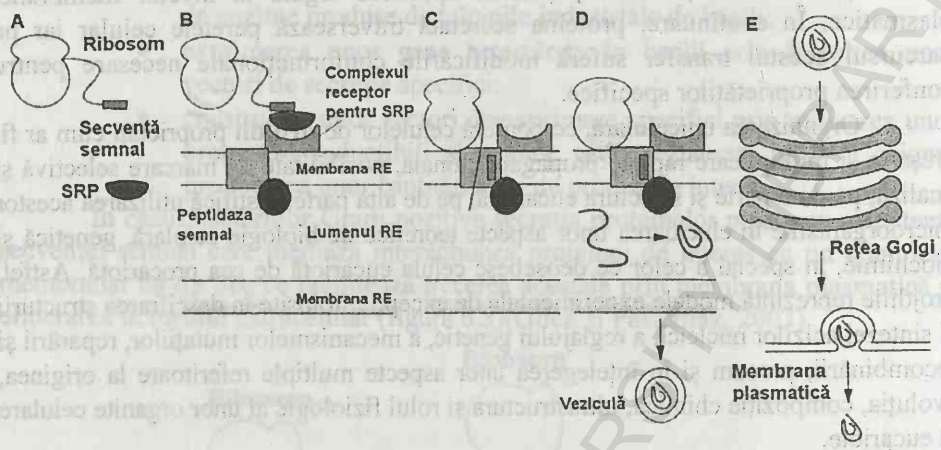


Figura 6.4. Reprezentarea schematică a procesului de secreţie al proteinelor la eucariote (explicaţia în text) (după Glick şi Pasternak, 2003)

În afara grupurilor de organisme menţionate, în transferul de gene mai pot fi utilizate drept gazde sau drept surse de material genetic organismele vegetale, diverse specii animale şi, nu în ultimul rând, mamiferele. De la acestea se pot folosi anumite organe sau tipuri de ţesuturi, existând o serie de particularităţi care condiţionează acest lucru. O categorie specială de celule eucariote utilizate în experimentele de inginerie genetică o reprezintă celulele aflate în cultură. Deşi procedeele de obţinere a culturilor de celule eucariote diferă în funcţie de specia ce furnizează materialul biologic (insecte, celule vegetale sau mamaliene), există o serie de puncte comune între acestea. Astfel, iniţial are loc prelevarea unui fragment de ţesut care este supus unui tratament enzimatic ce vizează separarea celulelor de matrixul extracelular, Celulele astfel separate sunt apoi introduse într-un mediu de cultură specific, lichid sau solid, ce conţine aminoacizi, vitamine, săruri, glucoză şi factori de creştere, mediu în care încep să se multiplice activ şi să formeze cultura celulară primară. De regulă, asemenea culturi celulare primare pot fi menţinute un timp limitat (50-100 generaţii celulare), după care celulele îşi pierd capacitatea de diviziune şi mor. În cazul celulelor animale, culturile celulare primare păstrează unele dintre proprietăţile tipului celular din care au provenit, motiv pentru care ele sunt utilizate pentru studierea particularităţilor biochimice ale unor ţesuturi variate. Deseori însă, pe parcursul pasărilor celulelor din cultura primară, unele celule suferă modificări la nivel genetic care le conferă proprietăţi legate de creşterea pe timp nelimitat în cultură. În acest caz, pornindu-se de la asemenea celule se pot obţine linii celulare care pot păstra câteva printre caracteristicile biochimice ale celulelor de origine, ele fiind utilizate în biotehnologia moleculară (pentru menţinerea şi multiplicarea unor virusuri, pentru identificarea proteinelor codificate de secvenţe de ADN clonat sau pentru obţinerea, la nivel industrial, a unor compuşi biologic activi de tipul vaccinurilor, a hormonilor sau a altor proteine heterologe).

6.2. ETAPELE TEHNOLOGIEI ADN RECOMBINANT

Elaborarea tehnologiei ADN recombinant nu ar fi fost posibilă fără existența unor „unelte" de lucru specifice, între care endonucleazele de restricție (enzimele de restricție) ocupă un loc aparte. Endonucleazele de restricție sunt nucleaze care clivează acizii nucleici în interiorul moleculei, deosebindu-se astfel de exonucleaze a căror acțiune se exercită de la extremitățile moleculelor de acizi nucleici.

Enzimele restricție sunt produse de către bacterii, fiind răspunzătoare de fenomenul de degradare a moleculelor de ADN străin ce pătrund în interiorul celulelor bacteriene. Aceste enzime, după "recunoașterea" unei secvențe nucleotidice specifice, hidrolizează moleculele de ADN dublu catenar. Hidroliza ADN se realizează prin clivarea a două legături fosfodiesterice, situate câte una pe fiecare catenă a moleculei de ADN, determinând producerea unui număr limitat de fragmente per moleculă. În celulele de origine endonucleazele de restricție fac parte integrantă dintr-un sistem de restricție și modificare, alcătuit dintr-o restrictază și o enzimă de modificare. "Modificarea", realizată în special prin metilare, protejează ADN propriu de restricție, în timp ce ADN străin provenit din exterior, fiind lipsit de o modificare adecvată, este sensibil la distrugerea cu endonucleaze de restricție (Wilson și Murray, 1991).

Trăsătura de bază a unui sistem de restricție și modificare este aceea că tulpina bacteriană producătoare prezintă o activitate de metilare a ADN propriu cu aceeași specificitate de secvență ca și activitatea restrictazică. Metilaza adaugă grupări metil la resturile de adenină sau citozină de la nivelul situsurilor țintă ale enzimei de restricție corespunzătoare, ceea ce conferă respectivelor molecule de ADN rezistență la acțiunea restrictazei (protejează ADN propriu de "autodigestia" pe care ar produce-o enzima de restricție sintetizată).

Toate endonucleazele de restricție recunosc scurte secvențe de nucleotide de la nivelul macromoleculelor de ADN, secvențe ce reprezintă situsurile de recunoaștere și legare. Legarea este urmată de clivarea legăturilor fosfodiesterice, fie la nivelul situsului de recunoaștere, fie la depărtare de acesta, în funcție de enzimă.

Una dintre caracteristicile enzimelor de restricție este aceea că ele recunosc anumite secvențe de nucleotide (situsul de recunoaștere) și clivează în mod specific legăturile fosfodiesterice dintre anumite nucleotide (situsul de clivare), situsurile fiind plasate pe ambele catene ale ADN. În cazul multor enzime de restricție, situsul de recunoaștere coincide cu cel de clivare (mai ales la enzimele de restricție de tip II), fiind format dintr-un număr limitat de nucleotide (4, 5, 6, 7 sau 8 perechi

de nucleotide), cu structură de palindrom. De exemplu, enzima Eco RI recunoaşte o secvenţă specifică formată din 6 nucleotide, GAATTC (tabelul 6.1). Uneori, palindromul este întrerupt de o serie de 1 până la 9 nucleotide nespecifice. De exemplu, endonucleaza de restricţie Sfi I recunoaşte secvenţa G G C C N N N N N G G C C, unde N poate fi orice bază azotată.

Tabelul 6.1

Situsul de recunoaştere şi modul de clivare al unor enzime de restricţie (după Vătafu şi Cornea, 2000)

Tulpina bacteriană	Denumirea enzimei	Situs de recunoaştere şi clivare
Anabaena variabilis	Ava I	C↓CGGAG
Bacillus amyloliquefaciens	Bam HI	G↓GATCC
Bacillus globigii	Bgl II	A↓GATCT
Escherichia coli	Eco RI	G↓AATTC
Haemophilus aegyptius	Hae III	GG↓CC
H. haemolyticus	Hha I	GCGC
H.parainfluenzae	Hpa II	C↓CGG
H.influenzae Rd	Hind III	A↓AGCTT
Moraxella bovis	Mbo I	↓GATC
Providencia stuartii	Pst I	CTGCA↓G
Serratia marcescens	Sma I	CCC↓GGG
Streptomyces stanford	Sst I	GAGCTC
Thermus aquaticus	Taq I	T↓CGA
Xanthomonas malvacearum	Xma I	C↓CCGGG

Un aspect important de care se ţine seama atunci când se alege o enzimă de restricţie pentru un anumit tip de experiment este acela al tipului de extremităţi pe care le generează enzima după clivarea macromoleculei de ADN. Se cunoaşte faptul că enzimele de restricţie ce recunosc secvenţe de tip palindrom rup legăturile fosfodiesterice la nivelul acestor secvenţe, generând fie extremităţi monocatenare complementare 3' sau 5' (atunci când clivarea se face decalat în raport cu axul de simetrie al secvenţei palindromice)(figura 6.5), fie extremităţi drepte (atunci când clivarea se face în aceeaşi poziţie pe ambele catene ale ADN) (figura 6.6).

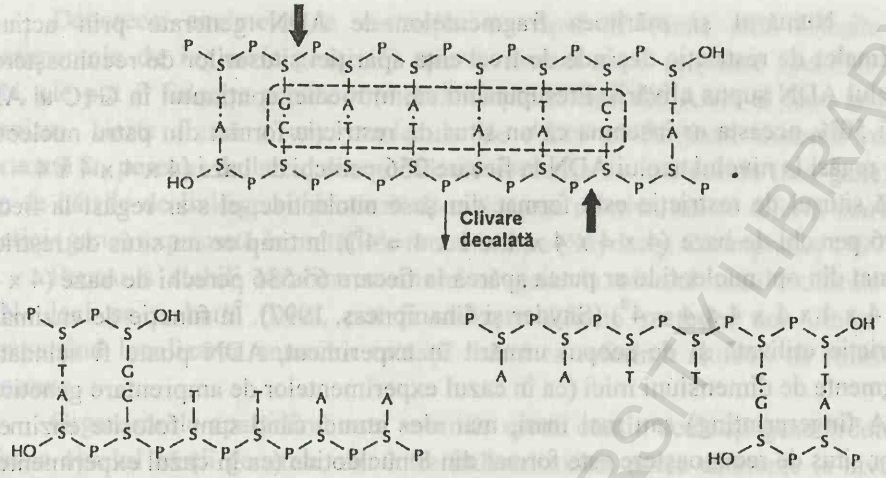


Figura 6.5. Modul de clivare al enzimelor de restricție ce formează fragmente lineare cu extremități monocatenare complementare

În cazul fragmentelor de restricție cu extremități monocatenare, ele se pot reasocia pe baza complementarității, între ele stabilindu-se legături de hidrogen; legarea este mai stabilă atunci când extremitățile respective conțin mai multe baze azotate de tip GC (Cornea, 2002).

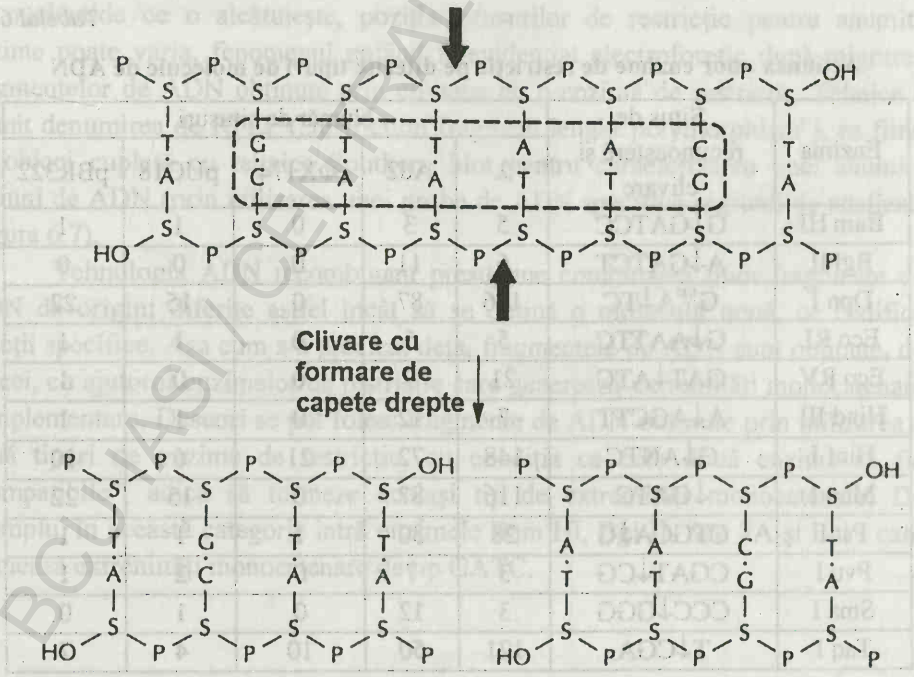


Figura 6.6. Producerea de fragmente de restricție cu extremități drepte

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Numărul şi mărimea fragmentelor de ADN generate prin acţiunea enzimelor de restricţie depinde de frecvenţa apariţiei situsurilor de recunoaştere la nivelul ADN supus clivării. Presupunând că, în medie, conţinutul în G+C al ADN ar fi 50%, aceasta ar însemna că un situs de restricţie format din patru nucleotide s-ar regăsi la nivelul acelui ADN la fiecare 256 perechi de baze ($4 \times 4 \times 4 \times 4 = 4^4$); dacă situsul de restricţie este format din şase nucleotide, el s-ar regăsi la fiecare 4096 perechi de baze ($4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 = 4^6$), în timp ce un situs de restricţie format din opt nucleotide ar putea apărea la fiecare 65.536 perechi de baze ($4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 \times 4 = 4^8$) (Snyder şi Champness, 1997). În funcţie de enzima de restricţie utilizată şi de scopul urmărit în experiment, ADN poate fi scindat în fragmente de dimensiuni mici (ca în cazul experimentelor de amprentare genetică = DNA fingerprinting) sau mai mari, mai ales atunci când sunt folosite enzime al căror situs de recunoaştere este format din 8 nucleotide (ca în cazul experimentelor de clonare a unor fragmente genomice sau în cele de cartare genetică).

Pentru testarea acţiunii enzimelor de restricţie se pot utiliza diferite tipuri de ADN la care se cunoaşte numărul de situsuri de recunoaştere (stabilit prin studii anterioare). Dintre acestea, cele mai utilizate molecule de ADN provin de la bacteriofagul λ, de la adenovirusul Ad2, bacteriofagul ΦX174, plasmida pUC18 sau pBR322 (tabelul 6.2).

Tabelul 6.2.

Acţiunea unor enzime de restricţie pe diferite tipuri de molecule de ADN

Enzima	Situs de recunoaştere şi clivare	Număr de situsuri				
		λ	Ad2	ΦX174	pUC18	pBR322
Bam HI	G↓GATCC	5	3	0	1	1
Bgl II	A↓GATCT	6	11	0	0	0
Dpn I	G^{me}A↓TC	116	87	0	15	22
Eco RI	G↓AATTC	5	5	0	1	1
Eco RV	GAT↓ATC	21	9	0	0	1
Hind III	A↓AGCTT	7	12	0	1	1
Hinf I	G↓ANTC	148	72	21	6	10
Mbo I	↓GATC	116	87	0	15	22
Pst I	CTGCA↓G	28	30	1	1	1
Pvu I	CGAT↓CG	3	7	0	2	1
Sma I	CCC↓GGG	3	12	0	1	0
Taq I	T↓CGA	121	50	10	4	7

↓ = indică locul clivării; N = reprezintă orice nucleotidă;
G^{me} = indică starea metilată a bazei respective

Deoarece enzimele de restricție de tipul II (cele mai folosite în experimentele de inginerie genetică) taie la nivelul unor secvențe specifice ale ADN, ele pot fi folosite pentru obținerea hărților fizice ale ADN al unui anumit organism. Harta fizică a unei molecule de ADN evidențiază distanța reală, exprimată în perechi de baze, dintre diferite secvențe de nucleotide (sau gene) în timp de hărțile de linkage evidențiază doar distanța relativă dintre diferiți markeri genetici (gene) exprimată în unități de recombinare (Snyder şi Champness, 1997).

Pentru a stabili localizarea anumitor gene la nivelul unei molecule de ADN, deci pe o hartă fizică, pot fi utilizate diferite metode, una dintre ele presupunând localizarea anumitor mutații luând ca referință situsuri de restricție cunoscute.

Organismele aparținând unei anumite specii conțin aceleaşi gene ordonate la fel la nivelul hărții genetice, dar între indivizi există unele diferențe la nivelul secvenței de nucleotide din ADN. Aceste diferențe asigură polimorfismul individual, iar în genetică termenul se referă la formele pe care o genă le poate prezenta în cadrul speciei. Polimorfismul genetic a fost utilizat din cele mai vechi timpuri, la început în mod empiric, pentru ameliorarea organismelor: prin încrucişarea a doi indivizi diferiți aparținând aceleiaşi specii s-au obținut organisme noi, cu performanțe îmbunătățite.

Deoarece diferitele forme ale unei gene se datorează variațiilor în secvența de nucleotide ce o alcătuieşte, poziția situsurilor de restricție pentru anumite enzime poate varia, fenomenul putând fi evidențiat electroforetic după migrarea fragmentelor de ADN obținute prin clivarea cu o enzimă de restricție. Tehnica a primit denumirea de RFLP („restriction fragment lenght polymorphism"), ea fiind de obicei cuplată cu tehnica Southern blot pentru caracterizarea unei anumite regiuni de ADN (prin utilizarea unei probe de ADN specifică regiunii de analizat) (figura 6.7).

Tehnologia ADN recombinant presupune combinarea unor fragmente de ADN de origini diferite astfel încât să se obțină o moleculă nouă, ce codifică funcții specifice. Aşa cum s-a precizat deja, fragmentele de ADN sunt obținute, de obicei, cu ajutorul enzimelor de restricție care generează extremități monocatenare complementare. Deseori se pot folosi fragmente de ADN obținute prin utilizarea a două tipuri de enzime de restricție, cu condiția ca cele două enzime să fie „compatibile", adică să formeze acelaşi tip de extremități monocatenare. De exemplu, în această categorie intră enzimele Bam HI, Bgl II, Sau 3A şi Bcl I care formează extremități monocatenare de tip GATC.

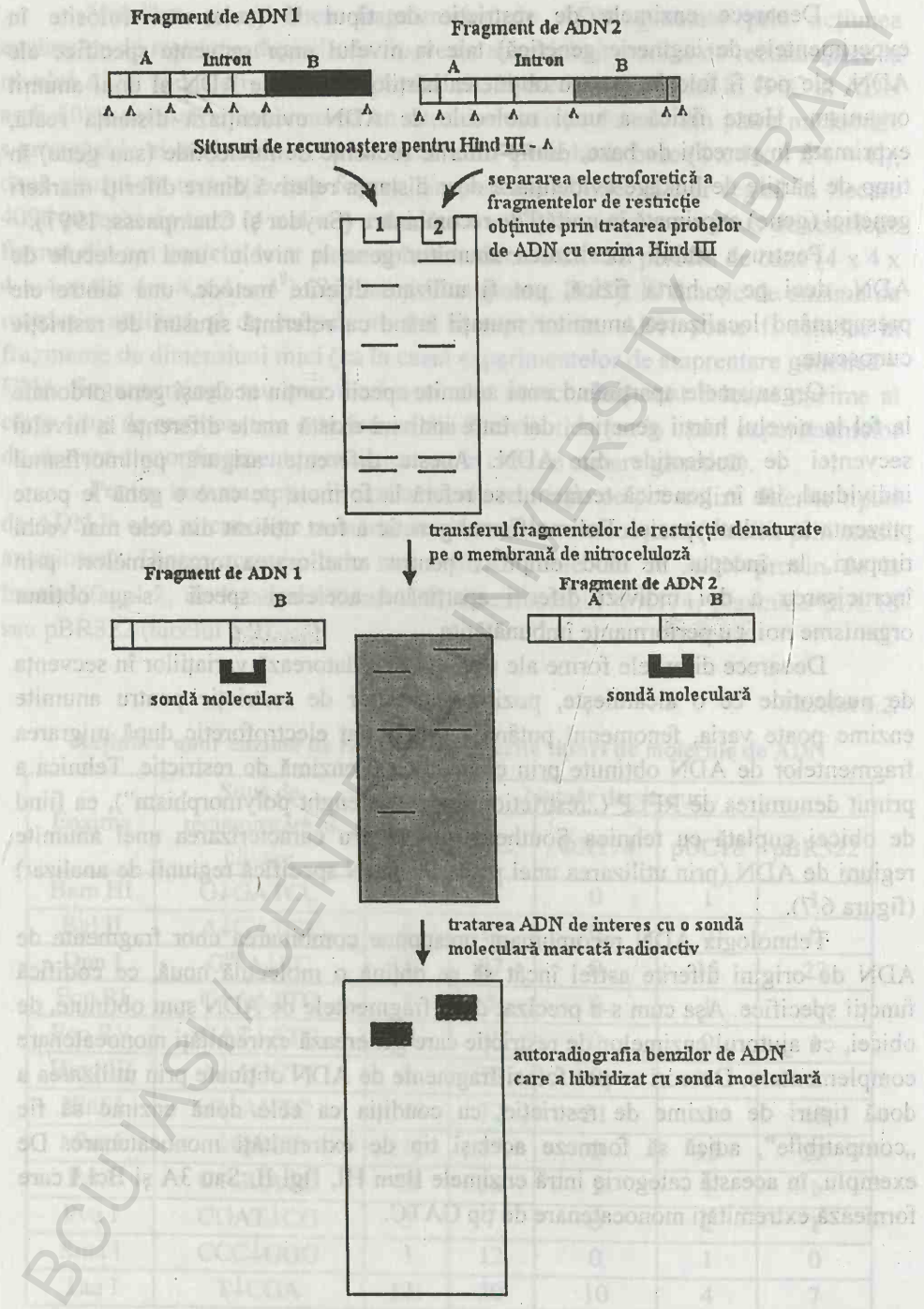


Figura 6.7. Reprezentarea schematică a etapelor tehnicii RFLP, aplicate în scopul identificării localizării unei gene la nivelul unui fragment de restricţie, pe două probe de ADN (1 şi 2) (după Bougaize şi colab., 2000)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Alături de enzimele de restricție,în tehnologia ADN recombinant sunt utilizate și alte tipuri de enzime, fie pentru obținerea ADN de interes fie pentru analiza acestuia. Dintre acestea sunt de menționat ADN polimerazele, diverse nucleaze, fosfataza alcalină, polinucleotid kinaza etc (tabelul 6.3).

Tabelul 6.3.

Enzime utilizate în tehnologia ADN recombinant

Enzima	Activitatea
Fosfataza alcalină	Îndepărtează gruparea fosfat de la extremitatea 5' a moleculelor de ADN
DN-aza I	Degradează ADN dublu catenar prin hidrolizarea legăturilor fosfodiesterice interne
Exonucleaza III de la *E.coli*	Îndepărtează treptat nucleotidele de la capătul 3'OH
Fragmentul Klenow	Fragment derivat prin proteoliză de la ADN polimeraza I; prezintă activitate polimerazică și exonucleazică doar de tip 3', cea de tip 5' fiind eliminată
Nucleaza BAL31	Degradează ADN de la ambele extremități (3' și 5') fără a produce clivări în interiorul moleculei
Poli(A) polimeraza	Adaugă AMP provenit din ATP la extremitatea 3'OH a ARNm
Reverstranscriptaza	ADN-polimerază retroviralâ dependentă de ARN
RN-aza H	Degradează moleculele de ARN din hibrizii de tip ADN-ARN
Nucleaza S1	Degradează ADN monocatenar
Polinucleotid kinaza de fag T4	Catalizează transferul de grupări fosfat terminale (γ) de la un nucleozid 5'trifosfat la gruparea 5'OH a unei polinucleotide de la care gruparea fosfat a fost anterior îndepărtată
ADN polimeraza de fag T7	ADN polimerază cu activitate exonucleazică de tip 3'
Taq ADN polimeraza	ADN polimerază termostabilă izolată de la *Thermus aquaticus*
ADN-ligaza	Asigură refacerea continuității unei catene de ADN prin formarea legăturilor fosfodiesterice între extremitatea 5'P și 3'OH a două fragmente de ADN
Terminal transferaza	Adaugă nucleotide la capătul 3' OH liber al ADN monocatenar, ADN dublu catenar sau chiar al ARN, acțiunea enzimatică nefiind dependentă de existența unei matrițe ADN

Obținerea și clonarea directă a ADN genomic de origine eucariotă este tehnic mai dificilă și, în consecință, s-a recurs la o tehnică indirectă de sinteză a genei sub forma de ADN complementar, pornind de la ARNm corespunzător. Tehnica a fost denumită **reverstranscriere** și se bazează pe utilizarea unei enzime specifice, reverstranscriptază, de origine virală. În acest scop, ARNm este izolat din țesutul în care gena dorită se exprimă la maximum. În anumite condiții fiziologice favorabile, un anumit tip de ARNm poate reprezenta între 0,1 și 10% din cantitatea de ARNm celular total. În alte cazuri el este prezent în cantități foarte mici. Izolarea ARNm și identificarea tipului dorit presupune anumite dificultăți. În general, alegerea unui anumit tip de ARNm se poate face prin determinarea capacității de a controla sinteza unei proteine specifice în sisteme acelulare sau prin hibridare cu oligonucleotide sintetice.

Deoarece la eucariote ARNm matur prezintă la capătul 3'OH o extremitate lungă de până la 150 nucleotide = capăt poliadenilat, pentru a se iniția sinteza ADN complementar se folosește un primer oligo dT, lung de aproximativ 10 nucleotide (resturi de timină), care va fi cuplat cu extremitatea poliadenilată. Această secvență constituie de fapt primerul de la care va începe polimerizarea nucleotidelor de către o ADN polimerază dependentă de ARN, denumită reverstranscriptază.

Toate variantele de clonare a ADN complementar dublu catenar pornesc de la sinteza unei copii ADN pe matrița de ARNm cu ajutorul reverstrancriptazei. Această copie monocatenară de ADN este convertită la forma dublu catenară cu ajutorul unei ADN-polimeraze "normale", după ce mai întâi se îndepărtează ARNm matriță prin tratament cu RN-aza H (enzimă ce degradează în mod specific ARN din duplexul ARN-ADN). ADN complementar monocatenar obținut prin reverstranscriere are la capătul 3' o buclă în "ac de păr", formată prin interacțiunea intramoleculară a bazelor componente și, pornind de la acest capăt, se inițiază sinteza catenei complementare (bucla funcționând ca "primer"). După încheierea sintezei catenei complementare (legată covalent de catena matriță) se elimină bucla monocatenară prin folosirea unei nucleaze (nucleaza S1) (figura 6.8).

Deseori nu este posibil să se separe un anumit tip de ARNm, în aceste situații preferându-se varianta de a obține biblioteci de ADN complementar, pornind de la ARNm total, izolat din anumite tipuri de celule. Obținerea bibliotecii complete sau parțiale de ADN complementar de la un anumit organism se face prin convertirea întregii populații de ARNm, sau doar a unei porțiuni din ea, în ADNc.

Moleculele de ADNc prezintă importanță pentru clonarea genelor dar, în același timp, reprezintă și o sursă pentru obținerea unor probe în vederea hibridizării, folosite ulterior pentru purificarea de ARNm specific.

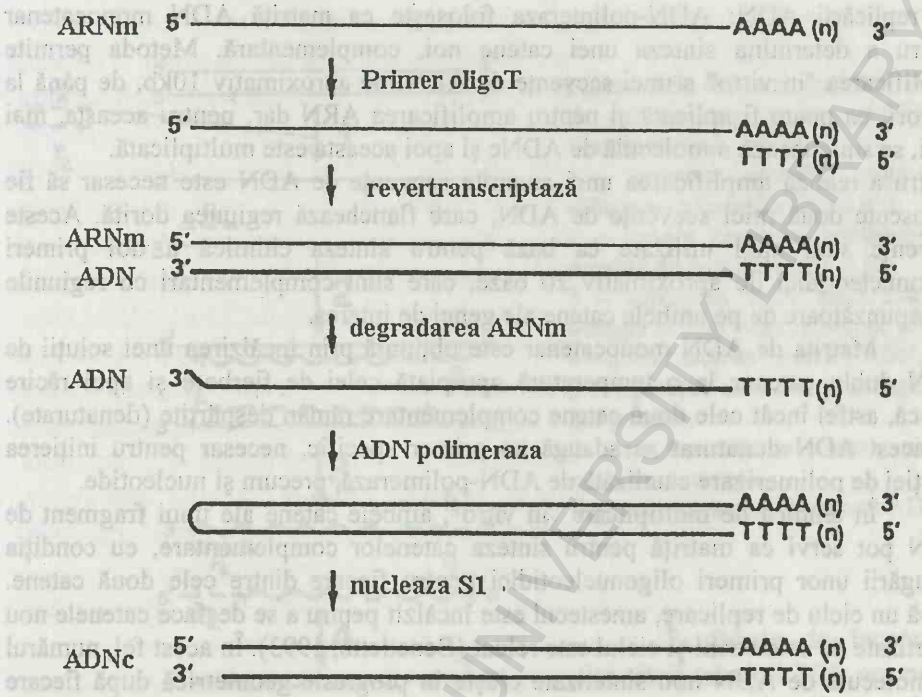


Figura 6.8. Etapele procesul de obținerea ADN de interes prin reverstranscriere

Pentru obținerea unor secvențe de ADN utile pentru clonare sau pentru analize genetice specifice se pot folosi diverse ADN polimeraze. Caracteristic acestor enzime este faptul că, pentru a acționa, ele au nevoie de o secvență de tip primer care să prezinte capătul 3'OH liber, alungirea catenei de ADN realizându-se în direcția 5' → 3' prin utilizarea unei alte catene de ADN drept matriță. In absența primerului, sinteza de ADN nu este posibilă.

Unele ADN polimeraze (cum este **ADN polimeraza I** produsă de *E.coli*) manifestă nu numai activitate polimerazică ci și exonuclează în sensul 5' → 3' și/sau 3' → 5' (eliminarea pe rând a nucleotidelor fie de la capătul 3' fie 5'). Activitatea exonuclează în sensul 3' → 5' este asociată *in vivo* cu rolul reparator al polimerazei respective: recunoașterea și apoi eliminarea nucleotidei incorect adăugată (necomplementară). Deseori însă, datorită activității exonucleazice 5'→ 3' a ADN polimerazei I, apar probleme ce țin de degradarea capătului 5' al primerilor și eliminarea grupărilor 5' fosfat de la capetele fragmentelor de ADN utilizate că substrat pentru ligare. De aceea, activitatea exonuclează 5'→ 3' poate fi eliminată prin tratament proteolitic, obținându-se un fragment de dimensiuni mari, numit **fragment Klenow**, capabil de activitate ADN polimerazică și exonuclează 3'→ 5'.

Elaborarea și apoi perfecționarea **tehnologiei PCR ("Polymerase Chain Reaction")** a determinat găsirea unor noi ADN polimeraze cu acțiune mai eficientă și, eventual termorezistente. Tehnica PCR utilizează unele trăsături fundamentale

ale replicării ADN: ADN-polimeraza foloseşte ca matriţă ADN monocatenar pentru a determina sinteza unei catene noi, complementară. Metoda permite amplificarea "in vitro" a unei secvenţe de ADN, de aproximativ 10kb, de până la 10^6 ori; ea poate fi aplicată şi pentru amplificarea ARN dar, pentru aceasta, mai întâi, se sintetizează o moleculă de ADNc şi apoi aceasta este multiplicată.
Pentru a realiza amplificarea unei anumite secvenţe de ADN este necesar să fie cunoscute două mici secvenţe de ADN, care flanchează regiunea dorită. Aceste secvenţe sunt apoi utilizate ca bază pentru sinteza chimică a doi primeri oligonucleotidici de aproximativ 20 baze, care sunt complementari cu regiunile corespunzătoare de pe ambele catene ale genei de interes.

Matriţa de ADN monocatenar este obţinută prin încălzirea unei soluţii de ADN dublu catenar la o temperatură apropiată celei de fierbere şi apoi răcire bruscă, astfel încât cele două catene complementare rămân despărţite (denaturate). La acest ADN denaturat se adaugă un primer specific, necesar pentru iniţierea reacţiei de polimerizare catalizată de ADN-polimerază, precum şi nucleotide.

În tehnica de multiplicare "in vitro", ambele catene ale unui fragment de ADN pot servi ca matriţă pentru sinteza catenelor complementare, cu condiţia adăugării unor primeri oligonucleotidici pentru fiecare dintre cele două catene. După un ciclu de replicare, amestecul este încălzit pentru a se desface catenele nou sintetizate de cele vechi şi ciclul este reluat (Benedetto, 1993). În acest fel, numărul de molecule de ADN nou sintetizate creşte în progresie geometrică după fiecare ciclu de replicare, estimându-se că, spre exemplu, după 32 cicluri de replicare se pot obţine 1.073.741.824 molecule de ADN dublu catenar, pornind de la o unică moleculă iniţială.

O etapă critică a acestei tehnici este alegerea primerilor specifici, dar utilizarea lor nu mai face necesară izolarea prin alte metode a secvenţei dorite de ADN dintr-o populaţie heterogenă de molecule de ADN. Cantitatea de ADN necesară ca material de start a reacţiei este foarte mică, sub 1 μg de ADN genomic total, dar se poate amplifica o secvenţă de ADN pornind chiar de la o singură moleculă.

Prima etapă a procesului de amplificare presupune încălzirea soluţiei de ADN la 94°C, timp de 5 minute, pentru a rupe legăturile de hidrogen, în aşa fel încât ambele catene complementare separate să poată servi ca matriţă pentru ADN-polimerază. La acest ADN se adaugă primerii oligonucleotidici ce vor fi folosiţi drept amorsă pentru ADN-polimerază, ca şi amestecul celor patru deoxiribonucleotide. Temperatura este apoi scăzută la 30-65°C pentru a asigura prinderea primerilor la secvenţele complementare din catena de ADN corespunzătoare. Continuarea experimentului depinde de valoarea temperaturii la care se desfăşoară acest eveniment (figura 6.9). Următoarea etapă constă în creşterea temperaturii la 72°C; această temperatură se menţine timp de 2-5 minute, pentru a se realiza procesul de polimerizare a ADN. Din nou, temperatura este crescută la 94°C pentru 20 secunde, pentru ca noile catene sintetizate să se desfacă de cele vechi, după care procesul se reia pentru 30-60 cicluri de sinteză.

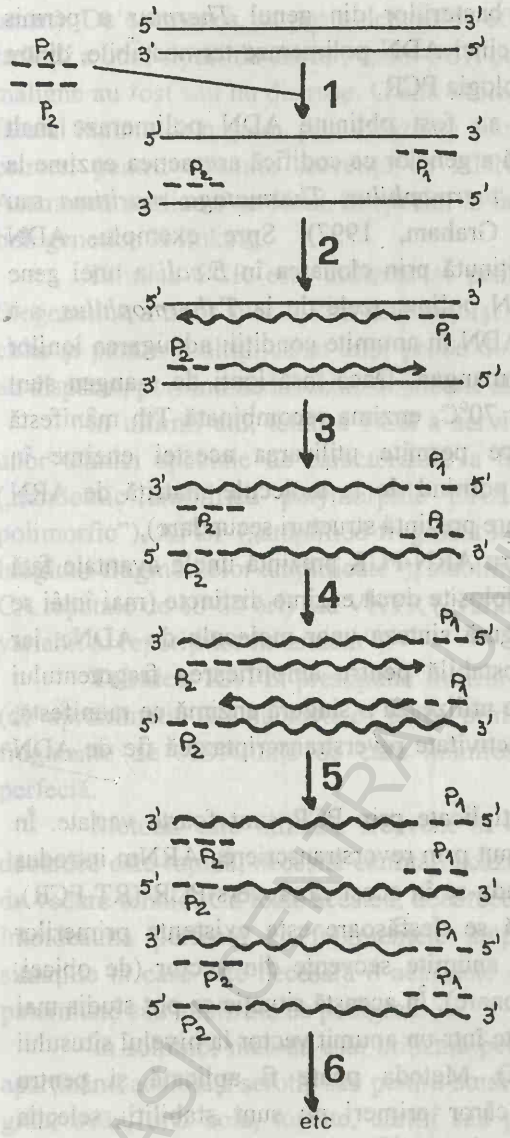


Figura 6.9. Schema realizării reacţiei de polimerizare în lanţ (PCR)(după Cornea şi colab., 1998)
1 – separarea catenelor originare şi adăugarea primerilor (P1 şi P2);
2 – sinteza catenelor complementare pornind de la primerii P1 şi P2;
3 – separarea celor două catene şi adăugarea unor noi cantităţi de primeri;
4 – nouă rundă de sinteză a ADN;
5 – separarea catenelor şi adăugarea de noi primeri;
6 – nouă rundă de sinteză, ciclurile putându-se repeta.
Săgeata indică sensul sintezei ADN.

În fazele de început ale elaborării tehnicii PCR era necesar să se adauge, după fiecare ciclu de sinteză, cantităţi noi de ADN polimerază, deoarece polimeraza de *E.coli*, fiind termosensibilă, era denaturată în momentul creşterii temperaturii.

Cercetările realizate pentru optimizarea procesului de polimerizare, în sensul găsirii şi utilizării unor ADN polimeraze capabile să reziste la variaţiile mari de temperatură pe care le presupune tehnica menţionată au condus la izolarea şi caracterizarea Taq polimerazei. Aceasta este o ADN polimerază termostabilă, ce acţionează eficient la temperaturi de 75-80°C.

Enzima a fost izolată de la o bacterie termofilă (*Thermus aquaticus*). Ca orice ADN polimerază, ea nu poate iniţia "de novo" sinteza de ADN, ci necesită pentru acţiune prezenţa unei secvenţe de nucleotide care să funcţioneze ca primer. O acţiune similară are şi enzima Pfu polimeraza izolată de la o altă bacterie termofilă, *Pyrococcus furiosus*, ea manifestând în plus şi o activitate exonuclează 3'→ 5', ceea ce îi măreşte fidelitatea. Utilizarea unei asemenea enzime pentru

sinteza ADN asigură o fidelitate de 12 ori mai mare decât cea obținută prin folosirea Taq polimerazei. Studierea bacteriilor din genul *Thermus* a permis izolarea de la specia *T.thermophilus* a cinci ADN polimeraze termostabile, dintre care două s-au dovedit eficiente în tehnologia PCR.

De asemenea, în ultimii ani au fost obținute ADN polimeraze înalt termostabile prin modificarea controlată a genelor ce codifică asemenea enzime la bacterii termofile cum sunt *Thermus thermophilus, Thermotoga maritima* sau *Thermococcus litoralis* (Newton și Graham, 1997). Spre exemplu, ADN polimeraza recombinată notată Tth, obținută prin clonarea în *E.coli* a unei gene modificate ce codifică una dintre ADN polimerazele de la *T.thermophilus,* s-a dovedit extrem de eficientă în sinteza ADN în anumite condiții: adăugarea ionilor de magneziu și chelarea cationilor de mangan. Dacă însă ionii de mangan sunt prezenți, la temperaturi de aproximativ 70°C, enzima recombinată Tth manifestă activitate de reverstranscriere, ceea ce permite utilizarea acestei enzime în experimentele de amplificare a ADN pornind de la molecule matriță de ARN (molecule bogate în secvențe G-C sau care prezintă structuri secundare).

Utilizarea Tth polimerazei pentru ARN-PCR prezintă unele avantaje față de procedeul convențional în care sunt folosite două enzime distincte (mai întâi se folosește o reverstranscripază, care asigură sinteza unor molecule de ADNc, iar apoi se utilizează o polimerază termostabilă pentru amplificarea fragmentului dorit). Avantajele constau în faptul că se utilizează o singură enzimă ce manifestă, în funcție de condițiile de reacție, fie activitate reverstranscriptazică fie de ADN polimerază.

Sursele de ADN ce pot fi multiplicate prin PCR sunt foarte variate. În primul rând, poate fi utilizat ADNc obținut prin reverstranscrierea ARNm introdus într-un vector de clonare, metoda numindu-se în acest caz revers-PCR (RT-PCR). Condiția ca reacția de polimerizare să se desfășoare este existența primerilor oligonucleotidici complementari pentru anumite secvențe din vector (de obicei, secvențele ce flanchează situsurile de clonare). În această situație se pot studia mai multe tipuri de fragmente de ADN clonate într-un anumit vector la nivelul situsului corespunzător (cu secvența cunoscută). Metoda poate fi aplicată și pentru identificarea secvențelor de ADN ai căror primeri nu sunt stabiliți: selecția fragmentelor obținute prin clonare și apoi amplificare se face cu ajutorul unor metode variate (de exemplu, Southern blotting). Ulterior, acest ADN poate servi pentru subclonare în diverse gazde sau se poate realiza secvențierea sa.

Pornind de la această aplicație inițială, metoda PCR a căpătat o largă utilizare în diverse domenii ale biologiei moleculare. Astfel, prin intermediul ei se poate stabili existența unor boli ereditare la nou-născuți, de exemplu a fenilcetonuriei. Tot cu ajutorul tehnicii PCR se pot amplifica secvențe specifice din genom, cum este cazul secvențelor Alu din genomul uman (regiuni ce conțin

aproximativ 10^6 copii ale unei secvențe de 300 pb, dispersate în întreg genomul uman). De asemenea, se poate determina eficiența tratamentului cu citostatice sau radiații a unor tipuri de cancer, testul PCR permițând să se stabilească dacă celulele maligne au fost sau nu distruse. O altă utilizare este legată de determinarea sexului fătului înainte de naștere, prin utilizarea unor celule fetale. În acest caz se folosesc primeri pentru anumite secvențe de ADN, conținute doar de cromosomul Y. Asemenea analize s-au făcut, în special la familii cu risc mare de a avea urmași cu boli genetice X linkate.

Tehnica PCR este utilizată și pentru studii moleculare asupra înrudirii filogenetice a unor specii. Prin acuratețe și sensibilitate, metoda a putut fi folosită chiar și pentru multiplicarea unor probe de ADN aparținând unor organisme care au dispărut, pornind de la resturi fosilizate ale acestora.

În ultimii ani, tehnica PCR a servit ca punct de start pentru dezvoltarea unor tehnici speciale de caracterizare a fragmentelor de ADN: tehnica RAPD („randomic amplified polymorphic DNA"=„amplificare randomizată a ADN polimorfic"), AFLP („amplified fragment lenght polymorphisms" = polimorfismul lungimii fragmentelor amplificate"), stabilirea microsateliților (secvențe de TG sau CA repetate de 10-60 ori) sau VNTR („variable number tandem repeats" = numărul variabil al repetițiilor în tandem").

Tehnica RAPD presupune utilizarea unor secvențe scurte de nucleotide (de aproximativ 10 nucleotide) drept primeri arbitrari pentru amplificarea unor fragmente de ADN față de care manifestă complementaritate, chiar dacă nu perfectă.

Metoda este utilizată frecvent în experimentele de amprentare genetică deoarece este rapidă, necesită cantități scăzute de material și este simplă din punct de vedere tehnic. Cu toate acestea, deoarece complementaritatea primerilor nu este întotdeauna perfectă cu fragmentele amplificate, metoda nu este aplicată în situațiile în care este necesară o acuratețe ridicată, așa cum este cazul testelor de paternitate sau analizele de pedigree.

În schimb, metoda este utilizată pentru caracterizarea tulpinilor bacteriene aparținând aceluiași serotip sau pentru studiile de ameliorare a plantelor (la căpșun, grâu, ovăz, orz, soia, tomate, cartof sau porumb), prin folosirea unor seturi de primeri arbitrari. Astfel, același primer folosit pentru amplificarea unor fragmente de ADN provenite de la linii înrudite de plante poate determina apariția unui profil electroforetic diferit, ceea ce poate ilustra, de exemplu, existența unor mutații la unele linii consangvine. Aceeași tehnică poate fi aplicată și microorganismelor, servind la identificarea unor specii sau stabilirea gradului de înrudire dintre diferite tulpini (figura 6.10).

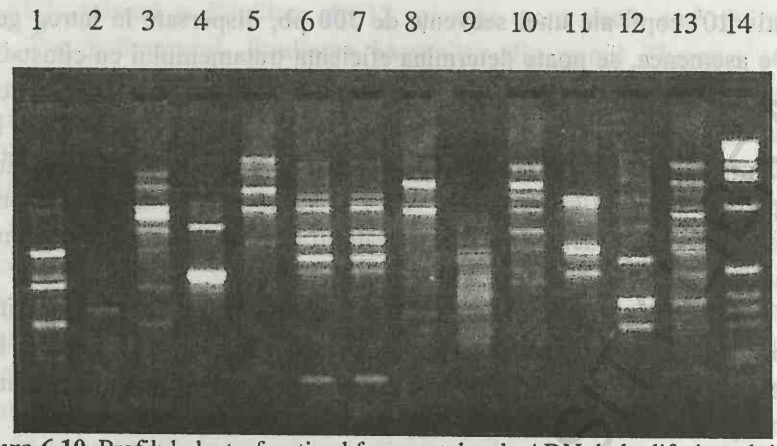


Figura 6.10. Profilul electroforetic al fragmentelor de ADN de la diferite tulpini de *Pseudomonas sp.* amplificate prin utilizarea primerului OPA03: 1.- *P. aeruginosa ATCC 27853*; 2 *Pseudomonas sp.P2;* 3. *Pseudomonas sp. Pspk2 (vg)*; 4.- *Pseudomonas sp. Pam 2*; 5.- *Pseudomonas sp.Rvi (va)*; 6.- *Pseudomonas sp.P12*; 7.- *Pseudomonas sp.Ps12 (va); 8- Pseudomonas sp.Ps13 (vg); 9- Pseudomonas* sp. ST4; 10 - *Pseudomonas* sp. SI P10; 11 – *P. fluorescens* AM1; 12 – *P. putida* 1; 13 - *Pseudomonas* sp.3d; 14 -ADNmarker (1 Kb);

Tehnica AFLP se bazează pe amplificarea selectivă a unor fragmente de restricție provenite prin clivarea ADN genomic cu o anumită enzimă de restricție. Astfel, după clivarea ADN de analizat cu una sau două endonucleaze, la fragmentele rezultate, se adaugă adaptori specifici, complementari cu extremitățile monocatenare generate de enzime. Se refac, în acest fel, la extremitățile fragmentelor, situsurile de recunoaştere pentru enzimele folosite (figura 6.11).

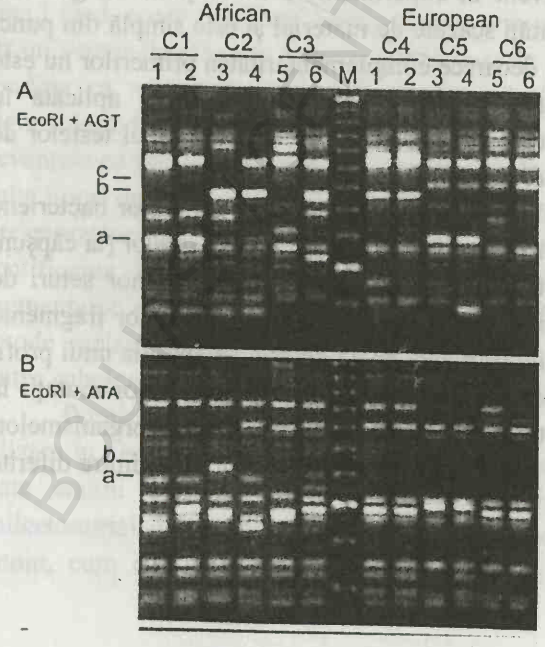


Figura 6.11. Comparație a profilului electroforetic al fragmentelor de ADN genomic de la două tipuri de albine, africane şi europene, obținute prin aplicarea tehnicii AFLP (după Suazo şi Hall, 1999)

Amplificarea se realizează prin utilizarea a 1-2 categorii de primeri a căror secvență de nucleotide corespunde situsurilor de recunoaştere pentru enzimele de restricție folosite (figura 6.11). Ca urmare, doar primerii complementari cu extremitatea 3' a fragmentului de restricție vor realiza amplificarea, rezultând o populație de fragmente amplificate. Din această populație de fragmente amplificate, prin utilizarea unor primeri cu o mai mare specificitate (conțin atât nucleotidele corespunzătoare situsului de restricție cât şi un număr de alte nucleotide, alese de experimentator) sunt apoi selectate o serie de fragmente care pot avea valoare de markeri moleculari. De remarcat că, în acest caz, primerii utilizați pot fi marcați radioactiv la extremitatea 5', prin folosirea unei polinucleotid kinaze şi a [γ-^{33}P] ATP, iar după separarea electroforetică în gel de poliacrilamidă 6% (care permite evidențierea şi a fragmentelor foarte mici), fragmentele amplificate sunt identificate prin autoradiografie.

Fragmentele de ADN de interes, fie că sunt obținute prin utilizarea metodelor menționate anterior sau prin alte metode (de exemplu, prin sinteză chimică) sunt mai întâi introduse într-un vector de clonare şi apoi transferate într-o gazdă corespunzătoare (bacterie, drojdie, celulă vegetală sau animală) în care se doreşte exprimarea.

Vectorii de clonare sunt molecule de ADN obținute „in vitro" care permit integrarea unui fragment de ADN de interes la nivelul unui situs specific, de obicei un „situs multiplu de clonare" („multiple cloning site" = MCS) (secvență de nucleotide recunoscută de mai multe enzime de restricție).

În general, pentru clonarea de gene se pot folosi mai multe tipuri de vectori, care în funcție de structură şi mod de funcționare pot fi: vectori plasmidiali, vectori virali şi vectori hibrizi. La rândul lor, vectorii hibrizi pot fi fagimide (cu structură hibridă, de plasmidă şi de fag filamentos) sau cosmide (cu structură hibridă, de genom de fag λ şi de plasmidă).

În funcție de posibilitatea studierii exprimării fragmentelor de ADN clonate vectorii pot fi:

- vectori de clonare care permit doar clonarea unei anumite secvențe de ADN, nu şi analiza exprimării sale, deoarece nu conțin secvențe promotor la nivelul situsului de inserție
- vectori de exprimare care au în structura lor secvențe ce permit exprimarea fragmentului de ADN clonat şi determină, în anumite situații, obținerea de proteine de fuziune.

De asemenea, în funcție de posibilitatea replicării şi menținerii stabile a vectorului în diferite gazde, vectorii de clonare pot fi:

- vectori congenerici ce pot fi folosiți doar la organisme aparținând aceluiaşi gen taxonomic
- vectori de tip „shuttle" (navetă) care se replică şi se mențin stabil în două gazde diferite.

În ultimii ani, cei mai utilizați vectori de clonare sunt cei de exprimare care conțin, pe lângă un promotor bacterian (de regulă) puternic, o regiune specifică (regiunea TIR = „translational initiation region") care asigură o traducere eficientă

a ARNm ce copiază gena clonată. Mai recent, vectorii de exprimare au fost diversificați, în sensul că pot fi folosite anumite regiuni din genomul unor bacteriofagi care determină o exprimare mai bună a genelor clonate și o acumulare de proteine de interes. De asemenea, în vectorii moderni pot fi utilizate diverse gene ce codifică pentru compuși ușor de detectat și purificat prin tehnici specifice (de exemplu prin cromatografie de afinitate). De exemplu, vectorii de tip pBluescript sunt vectori multifuncționali, construiți pentru a simplifica clonarea moleculară și analiza genetică. Comparativ cu alte tipuri de vectori, fagimidele pBluescript oferă unele avantaje în procesul de clonare (figura 6.12):

- clonare la nivelul unui MCS (polilinker), ce conține 20 situsuri diferite de restricție (SacI, Bst XI, Not I, Eag I, Xba I, Spe I, Bam HI, Sma I, Pst I, Eco RI, Eco RV, Hind III, Cla I, Sal I, Acc I, Hinc II, Xho I, Apa I, Dra II, Kpn I. Regiunea este încadrată de promotorii fagici T3 și T7, iar întreaga secvență este flancată de câte un situs pentru endonucleaza de restricție Bss HII (situs foarte rar în genomuri), cu ajutorul căreia poate fi, deci, excizată;

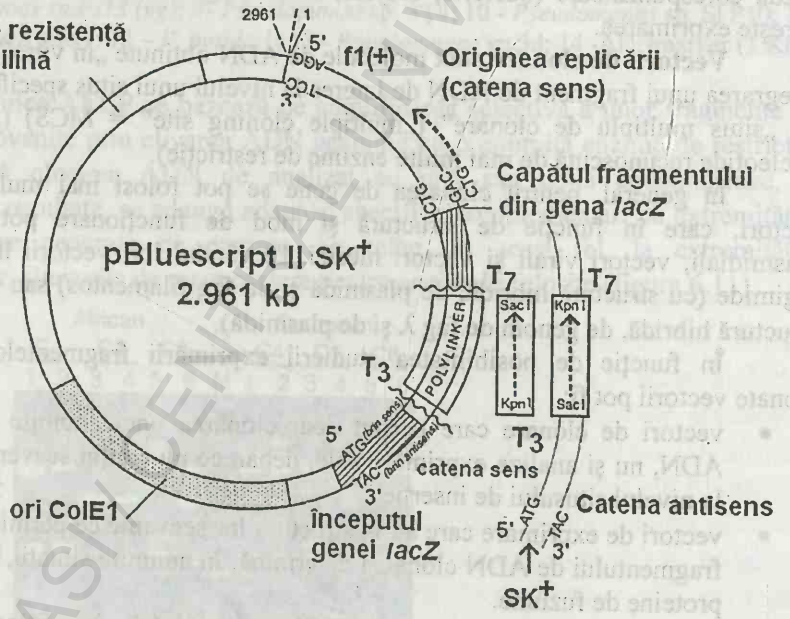


Figura 6.12. Reprezentarea schematică a vectorului pBluescript SK+/-. Ap^r = gena de rezistență la ampicilină; *ori* = originea replicării plasmidei (derivat de la ColE1); *lac* Z'= gena pentru sinteza β-galactozidazei; *lac* I= gena reglatoare a operonului *lac;* ori f1 (+) = originea replicării ca fag filamentos; MCS = situs multiplu de clonare; T3 și T7 = promotori specifici derivați de la fagii T3 și T7.

- selecția rapidă a clonelor recombinate (teste histochimice: pe mediu cu X-gal și IPTG coloniile recombinate sunt albe)

- transcrierea eficientă „in vitro" a ADN heterolog, mediată de promotorii T3 şi T7. Cei doi promotori se găsesc în orientare inversă unul faţă de celălalt şi, ca urmare, ADN heterolog clonat poate fi transcris de pe oricare dintre cele două catene, în funcţie de orientarea pe care o are în molecula de vector recombinat şi de activarea specifică a unuia sau altuia dintre promotorii fagici;
- obţinerea de monocatene de ADN datorită existenţei secvenţelor de origine virală (fag filamentos). Pentru a obţine ADN monocatenar, tulpina bacteriană în care se află vectorul recombinat este infectat cu un fag M13 defectiv ce conţine gena II mutantă. Produsul acestei gene virale va acţiona preferenţial asupra secvenţei *ori-f1* din fagimid, declanşând replicarea ADN pe modelul fagilor filamentoşi. În funcţie de orientarea regiunii de origine a replicării virale, ADN monocatenar rezultat va conţine catena sens sau cea antisens a genei *lac Z'*. Pentru a putea infecta gazda bacteriană cu un fag filamentos (cu M13) este necesar ca tulpina bacteriană să fie de tip Hfr, astfel încât să prezinte pili de sex la suprafaţa peretelui celular. Procesul de infectare a unei bacterii de către un fag filamentos presupune, ca primă etapă, ataşarea fagilor la nivelul pililor de sex;
- obţinerea de proteine de fuziune formate din proteina codificată de ADN heterolog şi β-galactozidaza), ceea ce asigură obţinerea unor cantităţi importante de proteine de interes.

Scopurile foarte variate ale experimentelor de inginerie genetică au determinat o permanentă perfecţionare a vectorilor utilizaţi, astfel încât aceştia să asigure succesul clonării în gazdele corespunzătoare.

Grupul vectorilor de exprimare este foarte heterogen, ei permiţând fie obţinerea ARNm pentru gena de clonată, fie sinteza polipeptidului codificat de aceasta. Vectorii de acest tip conţin situsuri de clonare plasate sub controlul unor promotori puternici, sau la capătul unei secvenţe semnal. În acest fel, în urma clonării se obţine o genă hibridă formată din gena de interes fuzionată cu o genă marker. Proteina de fuziune rezultată poate fi apoi transportată în citoplasmă, facilitându-se în acest fel purificarea sa.

Unii vectori plasmidiali de exprimare poartă promotori derivaţi de la bacteriofagii T3, T7 şi/sau SP6 alături de situsul multiplu de clonare (MCS). ADN inserat la nivelul MCS poate fi transcris "in vitro" atunci ADN plasmidial recombinat linearizat este incubat cu ARN polimeraza corespunzătoare şi cu precursorii de ribonucleotide. ARNm sintetizat poate fi sens (dacă gena a fost clonată şi citită în sensul corect) sau antisens (dacă gena a fost clonată în poziţie inversă celei normale). Din acest punct de vedere, fagimida pBluescript poate fi considerată că fiind un vector de exprimare deoarece situsul multiplu de clonare prezintă la un capăt promotorul T3 şi la celălalt promotorul T7 (fig.6.12). În acest fel, gena clonată la nivelul MCS poate fi transcrisă prin folosirea drept matriţă a ambelor catene de ADN, în mod alternativ, în funcţie de tipul de ARN polimerază

utilizată în reacția de transcriere. Moleculele de ARN sintetizate în acest mod pot reprezenta probe pentru hibridizare sau pot fi traduse la proteinele corespunzătoare în sisteme acelulare.

Clonarea moleculară reprezintă procesul de construire a unor molecule de ADN hibride (himere) prin inserția de informație genetică străină într-un vector (vehicul) adecvat, capabil să se replice independent. Hibridul molecular respectiv este utilizat pentru a transforma celulele bacteriilor receptoare (gazda obișnuită a experimentelor de clonare). Pentru integrarea fragmentelor de ADN străin în vector se pot folosi mai multe variante experimentale, ce presupun sau nu prelucrarea „in vitro" a fragmentului de ADN dorit, după care se realizează legarea covalentă a acestor fragmente cu ajutorul ADN-ligazelor.

Pentru obținerea moleculelor de ADN hibride au fost imaginate mai multe procedee dintre care, cele mai importante vor fi descrise în continuare.

Modalitatea cea mai simplă de incorporare este aceea care **utilizează fragmentele obținute cu ajutorul enzimelor de restricție de tipul II**, care clivează ADN la situsuri specifice palindromice, producând capete monocatenare complementare.

Astfel, utilizând aceeași enzimă de restricție atât pentru clivarea ADN exogen cât și a vectorului de clonare, se pot obține molecule hibride indiferent de proveniența ADN de interes, datorită extremităților monocatenare complementare identice.

Unirea inițială a segmentelor de restricție se face pe bază de complementaritate, prin formarea legăturilor de hidrogen la nivelul capetelor monocatenare, după care amestecul se tratează cu ligază, de obicei de fag T4, care reunește covalent moleculele respective (figura 6.13).

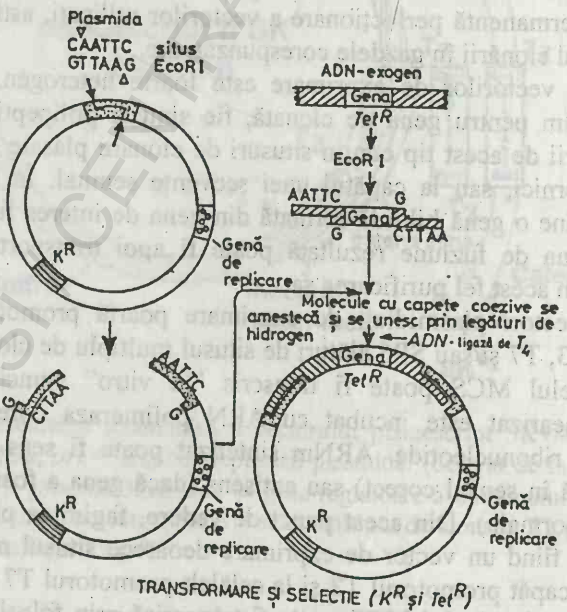


Figura 6.13. Realizarea moleculelor de ADN hibrid prin metoda legării capetelor coezive produse de o enzimă de restricție.

De notat că, transformarea bacteriilor gazdă se poate face direct cu amestec de fragmente de restricție fără a utiliza ligaza de fag T4, refacerea legăturilor fosfodiesterice fiind produsă de ligaza endogenă, specifică celulei transformate. În acest sistem de ligare „in vivo" a moleculelor, proporția de celule transformate ce conțin molecule hibride este, de aproximativ 1000 ori, mai mică comparativ cu sistemul care utilizează ligarea „in vitro".

Eficiența de obținere a moleculelor hibride poate fi mărită prin tratarea cu fosfatază alcalină a vectorului linearizat. Acest tratament determină îndepărtarea grupărilor 5'P terminale de la nivelul vectorului linearizat, prevenindu-se recircularizarea și formarea dimerilor plasmidiali. În acest caz, circularizarea vectorului se produce numai prin inserția ADN exogen netratat cu fosfatază alcalină, care va furniza capătul 5' fosfat necesar ligazei, la nivelul fiecărei legături. Cu toate acestea, la fiecare joncțiune rămâne câte o catenă nelegată, refacerea legăturilor fosfodiesterice fiind realizată în final de sistemele specifice (reparatorii) ale gazdei (figura 6.14).

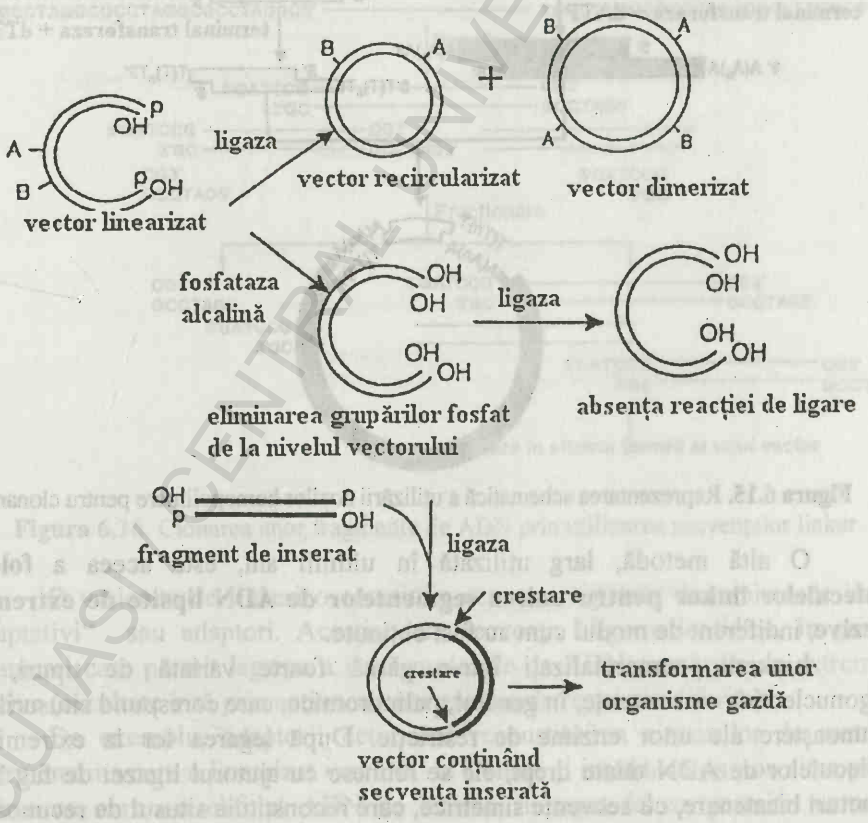


Figura 6.14. Reprezentarea schematică a utilizării fosfatazei alcaline în experimentele de clonare moleculară

Pentru realizare moleculelor de ADN recombinant pornind de la fragmente de ADN obținute prin metode diferite se poate folosi metoda **adăugării de extremități homopolimere complementare la secvențele de ADN de origine diferită.** Această metodă permite inserția mai eficientă, într-un vector de clonare corespunzător, a fragmentelor de ADN tăiate drept, fără decalaj (fără extremități monocatenare), produse de anumite enzime de restricție (Hae III, Hind II). Tehnica adăugării de capete homopolimere complementare se bazează pe proprietatea enzimei terminal-deoxinucleotidil transferaza de a extinde extremitățile 3'OH ale ADN, prin adăugarea progresivă de deoxiribonucleotide (dNTP). Enzima poate forma o catenă homopolimeră sau „coadă" cu o lungime definită, la ambele extremități 3'OH ale unui ADN dublu catenar complementar (sintetizat pe baza ARNm). Dacă asemenea extremități complementare se produc şi la capetele unei plasmide linearizate, prin amestecul lor se pot obține molecule recombinante, stabile (figura 6.15).

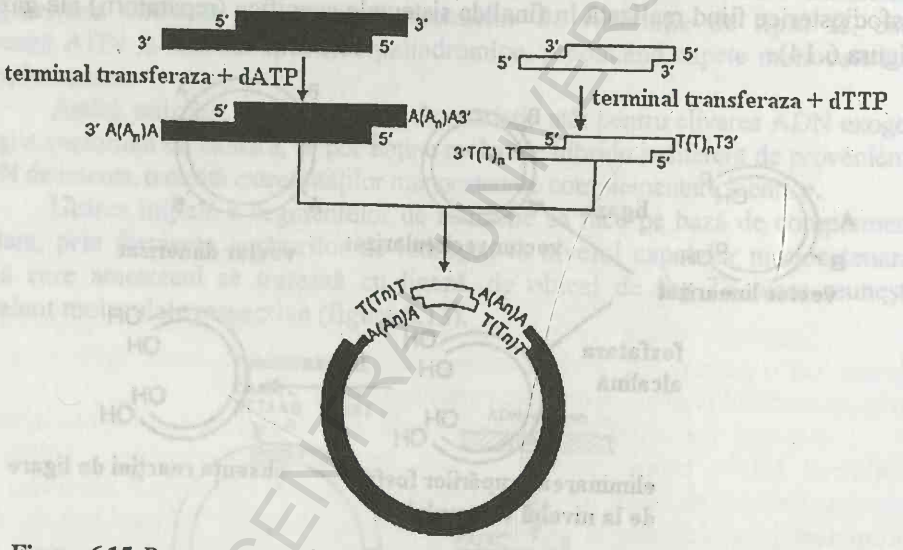


Figura 6.15. Reprezentarea schematică a utilizării cozilor homopolimere pentru clonare

O altă metodă, larg utilizată în ultimii ani, este aceea a **folosirii moleculelor linker pentru unirea segmentelor de ADN lipsite de extremități coezive**, indiferent de modul cum au fost obținute.

Linkerii, comercializați într-o gamă foarte variată de tipuri, sunt oligonucleotide cu secvențe, în general, palindromice, care corespund situsurilor de recunoaştere ale unor enzime de restricție. După legarea lor la extremitățile moleculelor de ADN tăiate drept, ele se reunesc cu ajutorul ligazei de fag T4 în structuri bicatenare, cu secvențe simetrice, care reconstituie situsul de recunoaştere al unei enzime de restricție.

Prin adăugarea linkerilor la extremitățile moleculelor de ADN se creează situsuri țintă pentru acțiunea enzimelor de restricție cu care se tratează atât ADN

heterolog cât şi molecula vectorului, apărând astfel extremități adezive complementare pentru clonare. Acest lucru permite, ulterior, reizolarea genei (genelor) din molecula de ADN recombinant prin folosirea enzimelor de restricție ce recunosc situsurile marginale (figura 6.16).

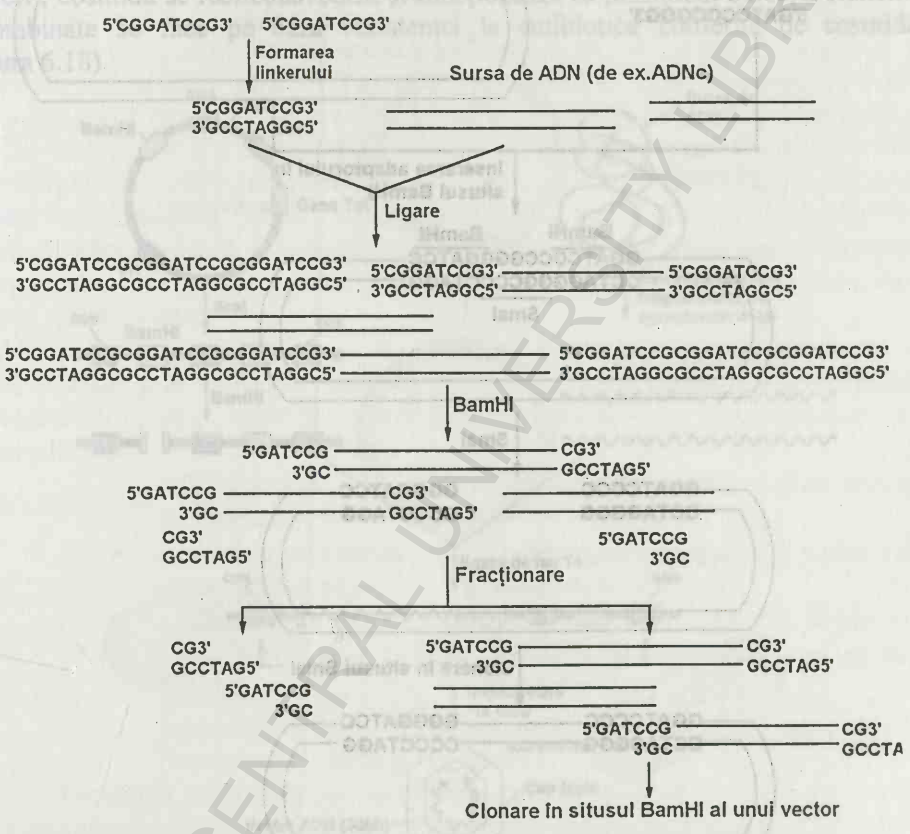


Figura 6.16. Clonarea unor fragmente de ADN prin utilizarea secvențelor linker

O varietate de linkeri o constituie cea care a primit denumirea de linkeri „adaptativi" sau adaptori. Aceştia sunt secvențe oligonucleotidice, în general decamere, care permit legarea a două molecule de ADN prevăzute cu extremități adezive (rezultate însă prin acțiunea unor enzime de restricție diferite).

De exemplu, adaptorii determină reconstituirea situsurilor de restricție pentru enzima care a linearizat vectorul de clonare şi introduce un nou situs pentru enzima cu care s-a obținut ADN de interes. În acest fel se permite nu numai reunirea unor fragmente obținute inițial prin utilizarea unor enzime de restricție diferite ci şi recuperarea ulterioară a fragmentului clonat pentru analize suplimentare (figura 6.17).

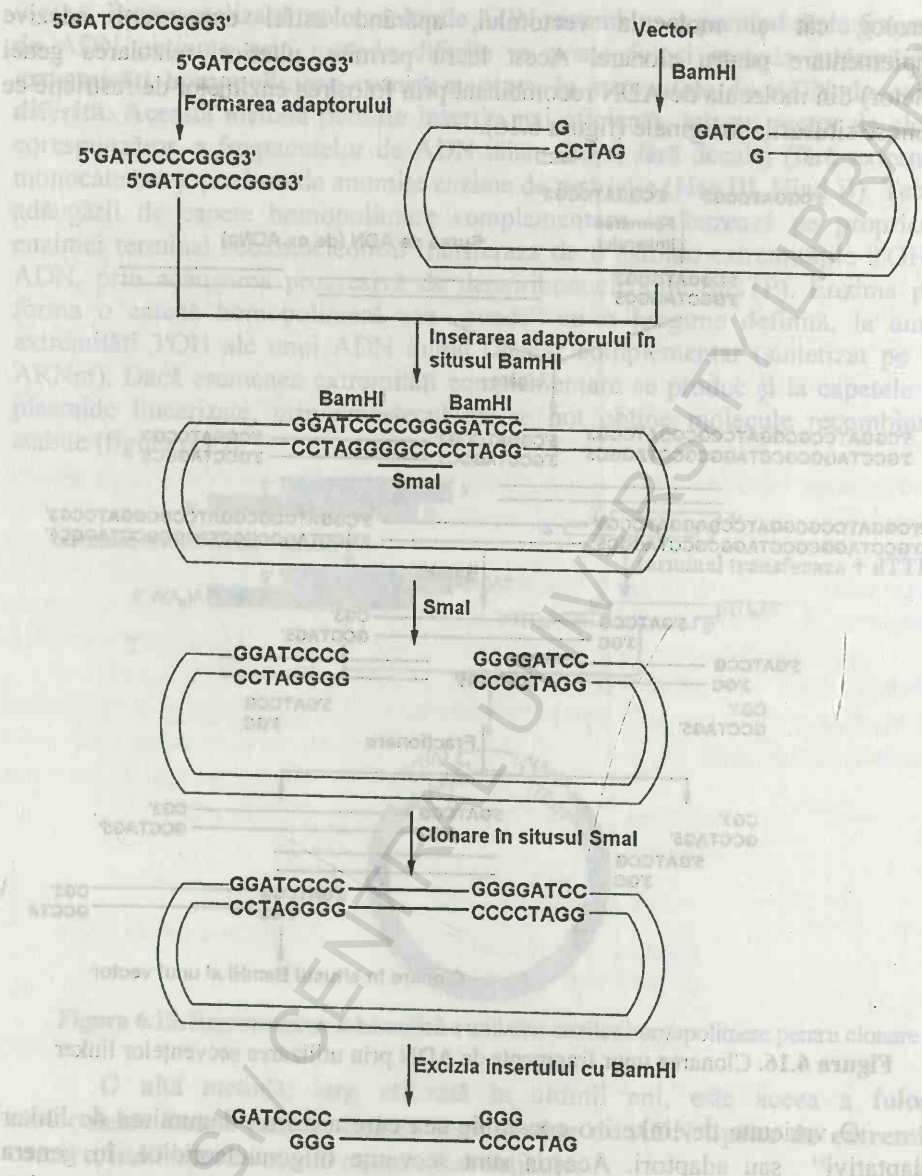


Figura 6.17. Reprezentarea schematică procesului de clonare prin folosirea adaptorilor (după Glick şi Pasternak, 2003)

O modalitate specială de clonare a genelor o reprezintă **folosirea ca vectori a cosmidelor.** Strategia generală de clonare în vectorii de tip cosmide este următoarea: se izolează vectorul în forma sa de plasmidă şi se linearizează prin clivare cu o enzimă de restricţie specifică. Aceeaşi enzimă este folosită pentru obţinerea fragmentelor de ADN de clonat; vectorul linearizat şi fragmentele de ADN genomic se amestecă, se tratează cu ligază, obţinându-se molecule lineare

recombinate de tipul *cos-ori*-Tet^r-ADN heterolog-*cos*; moleculele recombinate sunt supuse unui proces de împachetare „in vitro" prin tratarea cu un „extract de împachetare" sau cu un fag λ mutant (helper); se obțin în acest fel particule fagice (λ) ce conțin cosmida recombinată; prin infectarea unei gazde corespunzătoare (*E.coli*), cosmida se recircularizează și funcționează ca plasmidă. Selecția clonelor recombinate se face pe baza rezistenței la antibiotice conferită de cosmidă (figura 6.18).

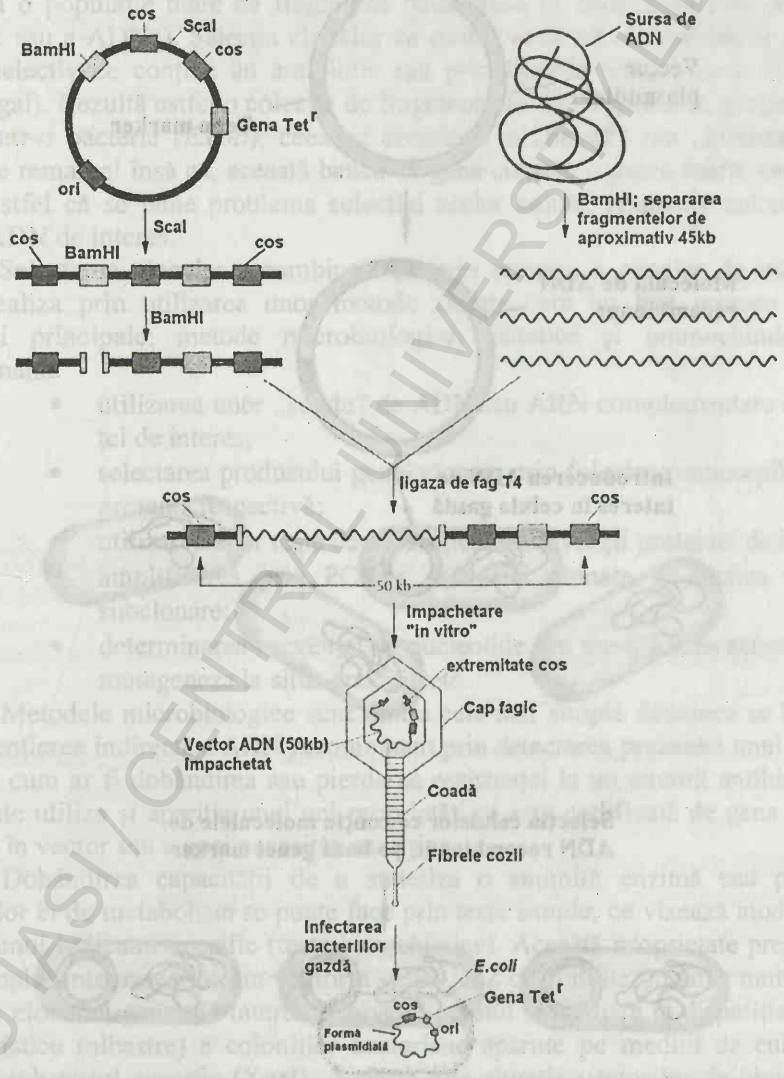


Figura 6.18. Sistemul de clonare a genelor în cosmide (explicația în text).

Indiferent de scopul experimentelor de inginerie genetică, menținerea și multiplicarea moleculelor de ADN recombinant este condiționată de pătrunderea lor într-o gazdă adecvată, în al cărei sistem genetic să se integreze și din care să

poată fi izolate cu uşurinţă. În acest scop, cea mai utilizată gazdă este reprezentată de *E.coli* (figura 6.19).

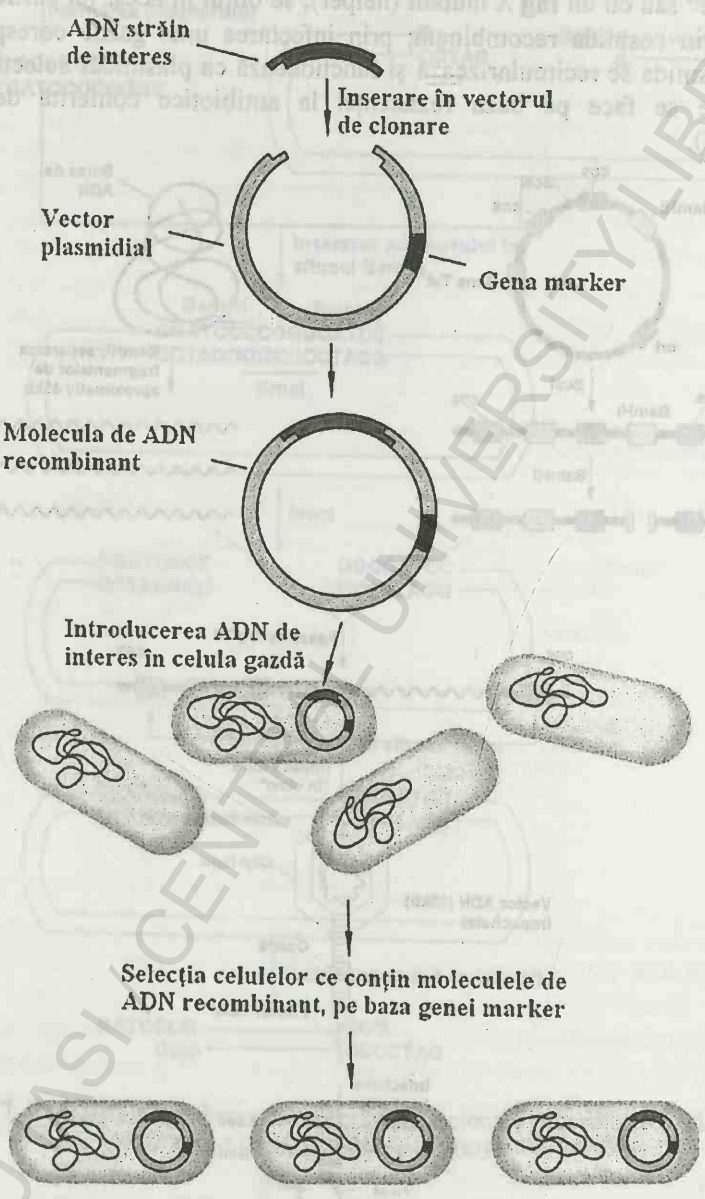


Figura 6.19. Model general de clonare a unui fragment de ADN într-o gazdă bacteriană (după Watson şi colab., 1992)

Moleculele de ADN recombinant multiplicate în această gazdă sunt reizolate şi introduse apoi în gazda în care se doreşte exprimarea materialului

genetic de interes. În acest fel se măreşte eficienţa procesului de transformare a altor gazde finale decât *E.coli.*

Selecţia şi analiza clonelor recombinate

Una dintre etapele esenţiale ale tehnologiei ADN recombinant este reprezentată de detectarea şi selecţia celulelor gazdă transformate, adică a celor ce conţin fragmentul de ADN dorit. Această etapă este foarte dificil de realizat dar absolut necesară, mai ales în cadrul experienţelor de tip „shotgun" prin care se clonează o populaţie mare de fragmente heterogene (a unor fragmente de ADN genomic sau a ADNc). Selecţia clonelor ce conţin vectorul recombinat se face pe mediu selectiv ce conţine un antibiotic sau prin metode histochimice (exemplu testul Xgal). Rezultă astfel o colecţie de fragmente de ADN genomic, propagate de obicei într-o bacterie (*E.coli*), ceea ce constituie o „bancă" sau „bibliotecă" de gene. De remarcat însă că, această bancă de gene conţine o gamă foarte variată de clone, astfel că se pune problema selecţiei acelor celule, respectiv colonii, care conţin ADN de interes.

Selectarea clonelor recombinate şi, prin urmare, a genelor de interes se poate realiza prin utilizarea unor metode variate care au fost grupate în trei categorii principale: metode microbiologice, genetice şi imunochimice, ele presupunând:

- utilizarea unor „sonde" de ADN sau ARN complementare secvenţei de interes;
- selectarea produsului genei clonate prin folosirea anticorpilor anti-proteina respectivă;
- utilizarea unor teste de evidenţiere a activităţii proteinei de interes;
- amplificarea prin PCR a secvenţei clonate şi analiza ei prin subclonare;
- determinarea secvenţei de nucleotide sau modificarea acesteia prin mutageneza la situs-specific etc.

Metodele microbiologice sunt dintre cele mai simple deoarece se bazează pe evidenţierea indirectă a ADN recombinant prin detectarea prezenţei unui marker genetic, cum ar fi dobândirea sau pierderea rezistenţei la un anumit antibiotic. Se mai poate utiliza şi apariţia unei noi proprietăţi ce este codificată de gena străină, inserată în vector sau a unei necesităţi nutritive.

Dobândirea capacităţii de a sintetiza o anumită enzimă sau prezenţa produşilor ei de metabolism se poate face prin teste simple, ce vizează modificarea culorii unui indicator specific (teste histochimice). Această proprietate presupune, de exemplu, integrarea într-un vector a genei *lacZ* ce conţine un situs multiplu de clonare; clonarea genei de interes la nivelul acestui situs duce la dispariţia culorii caracteristice (albastre) a coloniilor bacteriene apărute pe mediul de cultură ce conţine substratul specific (Xgal). Aceasta este situaţia vectorilor de clonare din categoria plasmidelor pUC (pUC18, pUC19), dar şi a unor fagimide (pBluescript), sistemul permiţând diferenţierea coloniilor purtătoare de plasmide recombinate de cele nerecombinate, pe baza modificării culorii lor după cultivarea pe mediu de cultură ce conţine substratul X-gal şi a inductorului, IPTG.

Metodele imunochimice sunt utilizate pentru identificarea şi izolarea celulelor care conţin vectori cu ADNc de origine eucariotă se poate folosi capacitatea acestora de a determina sinteza în *E.coli* a unor molecule proteice funcţionale. Pentru a simplifica evidenţierea acestora se folosesc anticorpi specifici proteinelor de interes, marcaţi de obicei radioactiv. Identificarea şi analiza produsului sintetizat de clonele recombinate este deosebit de importantă, deoarece numai pe baza lor se poate stabili succesul sau insuccesul experimentului.

De asemenea, pentru a demonstra existenţa într-o anumită probă a produsului unei gene de interes se poate folosi şi una dintre variantele testului ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay"), al cărui principiu este asemănător celui ce foloseşte anticorpi marcaţi radioactiv (test RIA), numai că se utilizează marcarea biochimică în locul celei radioactive (figura 6.20).

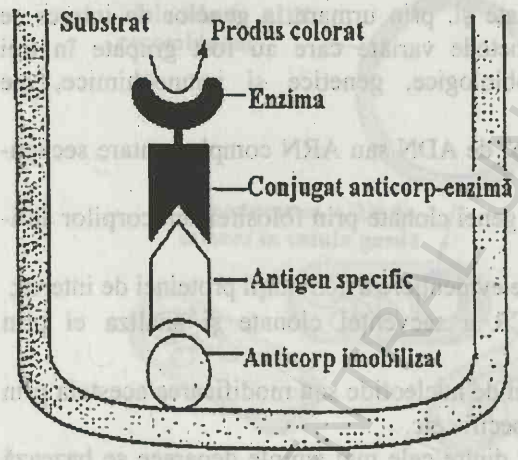


Figura 6.20. Reprezentarea schematică a detectării produşilor de interes (sintetizaţi de clonele recombinate) prin utilizarea metodei imunochimice

În principiu, acest test utilizează imobilizarea antigenului (sau substanţa pe care vrem să o detectăm) pe un suport solid, după care se cuplează cu anticorpul specific. Dacă antigenul este solubil, atunci se imobilizează anticorpii corespunzători şi se tratează cu antigenul. După spălarea complexului format (pentru îndepărtarea anticorpilor nelegaţi, sau a antigenului, în cazul celei de-a doua variante), se adaugă un al doilea tip de anticorpi, ce recunosc anticorpii anteriori. Ei sunt cuplaţi cu o enzimă (fosfatază alcalină, peroxidază) a cărei activitate poate fi uşor evidenţiată prin teste spectrofotometrice. În final, după îndepărtarea anti-anticorpilor nelegaţi, se determină activitatea enzimei cuplate folosindu-se un substrat specific (de obicei cromogen). Spre exemplu, folosirea în experiment a conjugatului anti-anticorp - fosfatază alcalină determină transformarea substratului cromogen β-nitrofenolfosfat (incolor) în β-nitrofenol, compus de culoare galbenă, intensitatea culorii fiind evaluată colorimetric (Cornea, 2002).

Metodele genetice permit detectarea cu mare sensibilitate și eficiență a genelor incorporate în vectorii de clonare. Se utilizează teste de hibridare în care identificarea coloniilor bacteriene sau a plajelor de liză ce poartă genele dorite se face cu ajutorul „sondelor" moleculare.

Secvențele nucleotidice de interes pot fi identificate prin hibridizare, după separarea electroforetică (în gel de agaroză) a fragmentelor de ADN rezultate, de obicei, prin clivare cu enzime de restricție (figura 6.21).

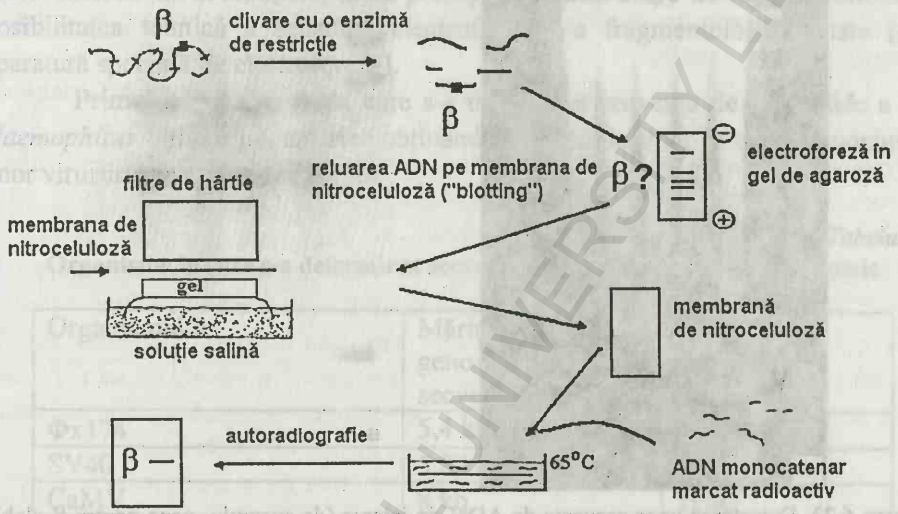


Figura 6.21. Reprezentarea schematică a etapelor implicate în detectarea unei gene de interes (de exemplu, a genei pentru β-globină (adaptare după Mathew, 1983)

Tehnica, elaborată în 1975 de către Southern și denumită după numele acestuia, presupune mai multe etape de lucru:

- purificarea moleculelor de ADN;
- migrarea electroforetică;
- transferul fragmentelor de ADN pe filtre de nitroceluloză;
- hibridizare, în condiții speciale, cu proba de ADN marcată (^{32}P);
- autoradiografia, ce presupune expunerea membranelor de nitroceluloză marcate la un film sensibil la radiații X, timp de mai multe zile, urmată de developare și fotografiere.

Metoda Southern este laborioasă și folosește probe de ADN sau ARNm marcate radioactiv, dar rezultatele sunt precise (figura 6.22).

Există și variante ale metodei descrise de Southern, care permit identificarea, după separare electroforetică, a unor molecule de ARN sau a unor proteine. Astfel, metoda Northern constă în identificarea moleculelor de ARN de interes, dintr-un amestec supus separării electroforetice; în acest caz, sonda moleculară este un fragment de ADN, complementar cu ARN căutat. În schimb,

metoda Western se referă la identificarea unor proteine de interes (de exemplu, a celor recombinate sau a celor codificate de genele clonate). După separarea proteinelor prin electroforeză în gel de poliacrilamidă, ele sunt reluate pe filtre de nitroceluloză, iar evidențierea se face cu ajutorul anticorpilor specifici.

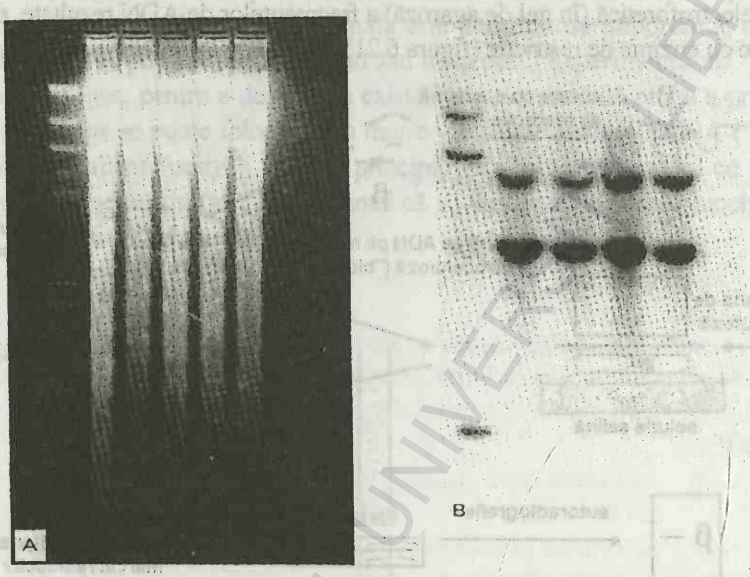


Figura 6.22. Detectarea unor secvențe de ADN de interes (de exemplu, gena pentru β-globina umană) prin utilizarea metodei Southern (după Mathew, 1983). A = separarea electroforetică a ADN clivat cu enzime de restricție; B = autoradiografia fragmentelor separate electroforetic prin utilizarea unei probe de ADN marcat.

În ultimii ani, au fost puse la punct metode de identificare „in situ" a secvențelor de ADN dorite, prin marcare neradioactivă sau radioactivă.

Tehnicile de hibridizare „in situ" permit detectarea unor secvențe specifice de ADN direct în cromosomi, în celule sau pe secțiuni de țesuturi variate. Combinată cu tehnici de imunocitochimie, hibridizarea „in situ" permite obținerea de informații asupra localizării celulare și a funcției genei (la nivel de ADN, ARNm și proteine).

Datorită condițiilor speciale pe care le necesită folosirea probelor marcate radioactiv, efortul cercetătorilor s-a îndreptat spre găsirea unor modalități de marcare neradioactivă a „sondelor" moleculare.

După clonare și selecția clonelor recombinate, fragmentul sau fragmentele de ADN de interes pot fi analizate prin mai multe metode. Pe de o parte, se pot utiliza diverse enzime de restricție pentru clivarea ADN clonat, după care fragmentele obținute sunt analizate prin electroforeză în gel de agaroză. De asemenea, gena de interes poate fi amplificată prin utilizarea tehnologiei PCR,

subclonată într-un vector specific şi introdusă într-o gazdă nouă, sau gena poate fi modificată prin mutageneză „in vitro" iar funcțiile sale (modificate) sunt studiate ulterior.

În multe experimente de tehnologia ADN recombinant este necesar ca, în final, să se stabilească secvența de nucleotide din diferite fragmente de ADN, fie chiar a întregului genom al unui organism. Pentru aceasta au fost elaborate mai multe metode de secvențiere, toate presupunând însă etape de lucru laborioase şi posibilitatea tehnică a separării electroforetice a fragmentelor rezultate (deci aparatură specială de electroforeză).

Primul organism viu la care s-a determinat secvența de nucleotide a fost *Haemophilus influenzae*, anterior obținându-se notabile doar în cazul genomurilor unor virusuri (tabelul 6.4).

Tabelul 6.4

Organisme la care s-a determinat secvența de nucleotide din ADN genomic

Organismul	Mărimea genomului secvențializat	Anul determinării secvenței
Φx174	5,4 kb	1977
SV40	5,8 kb	1979
CaMV	8 kb	1980
VMT	6,3 kb	1982
Bacteriofagul λ	48,5 kb	1982
Virusul vaccinei	192 kb	1990
Citomegalovirus	229 kb	1991
Haemophilus influenzae	1,9 Mb	1995
Mycoplasma genitalium	0,58 Mb	1995
Escherichia coli	4,3 Mb	1997
Bacillus subtilis	4,2 Mb	1997
Saccharomyces cerevisiae	12 Mb	1992-1997
Caenorhabditis elegans	97 Mb	1998
Drosophila melanogaster	137 Mb	2000
Homo sapies	3000 Mb	2001
Agrobacterium tumefaciens	2,84 Mb	2001
Bradyrhizobium japonicum	9,1 Mb	2002
Pyrococcus furiosus	1,91 Mb	2002
Staphylococcus aureus	2,8 Mb	2002
P.aeruginosa	6,26 Mb	2000
Streptomyces coelicolor	8,67 Mb	2002
Plasmodium falciparum	30 Mb	1998-2002
Mus musculus	2500 Mb	2002
Arabidopsis thaliana	125 Mb	2000

Până în prezent a fost determinată secvența de nucleotide de la peste 900 categorii de genomuri, dintre care majoritatea sunt virusuri (599), 20 bacteriofagi, 205 plasmide, 185 organite, 90 genomuri procariote dintre care 16 sunt arhebacterii, 74 aparțin eubacteriilor și opt genomuri eucariote (Harry, 2001). Cel mai recent (septembrie 2005) s-a comunicat descifrarea secvenței de nucleotide de la cimpanzeu dovedindu-se o omologie de 99% cu genomul uman.

Pentru obținerea secvențelor oligonucleotidice din ADN supus analizei pot fi utilizate două metode: metoda propusă de Sanger (1975) sau metoda descrisă de Maxam și Gilbert (1980).

Metoda Sanger presupune folosirea ADN monocatenar pentru stabilirea secvenței de nucleotide. Acesta poate fi obținut fie prin denaturarea ADN dublu catenar (izolat printr-o metodă specifică), fie prin clonarea fragmentelor de interes în vectori de tip fagimide și apoi stabilirea condițiilor de producere a ADN monocatenar (prin inducerea multiplicării ca fag filamentos a vectorului). Indiferent de metoda folosită pentru obținere, ADN monocatenar este folosit ca matriță pentru acțiunea ADN polimerazei I de la *E.coli*, la amestec fiind adăugate toate cele patru deoxiribonucleotide (dintre care una marcată radioactiv cu ^{32}P) precum și o scurtă secvență complementară sintetizată "in vitro", ce va fi folosită drept primer. Primerul se atașează specific la regiunea de omologie, de la nivelul său începând sinteza enzimatică a unor secvențe de 15-300 nucleotide.

În cadrul acestei metode există două variante de lucru: metoda "plus" și metoda "minus", ambele metode prezentând primele etape comune (figura 6.23). ADN polimeraza este utilizată mai întâi pentru a asigura sinteza unei catene complementare catenei matriță, ea conținând însă dNTP marcate. Deoarece sinteza nu este sincronizată se vor obține oligonucleotide de diferite lungimi. În metoda "minus", după îndepărtarea nucleotidelor neutilizate, amestecul de oligonucleotide cuplate cu matrița este incubat cu ADN polimeraza dar în absența uneia dintre cele patru dNTP.

Sinteza se desfășoară până când, în catena ce se sintetizează, ar trebui inclusă nucleotida lipsă. În acest fel, sinteza se va termina, la toate secvențele nucleotidice din amestec, la capătul 3' al acestora, la nivelul nucleotidei ce precede nucleotida absentă. Deoarece în experimente se realizează patru variante diferite (de fiecare dată omițându-se câte o nucleotidă), se poate obține un set complet de oligonucleotide ce respectă principiul descris mai sus. Noile catene sintetizate sunt apoi separate de matriță lor și supuse electroforezei în gel de poliacrilamidă, în prezența unei concentrații foarte mari de uree (8M), în final detectarea fragmentelor oligonucleotidice monocatenare făcându-se prin autoradiografie.

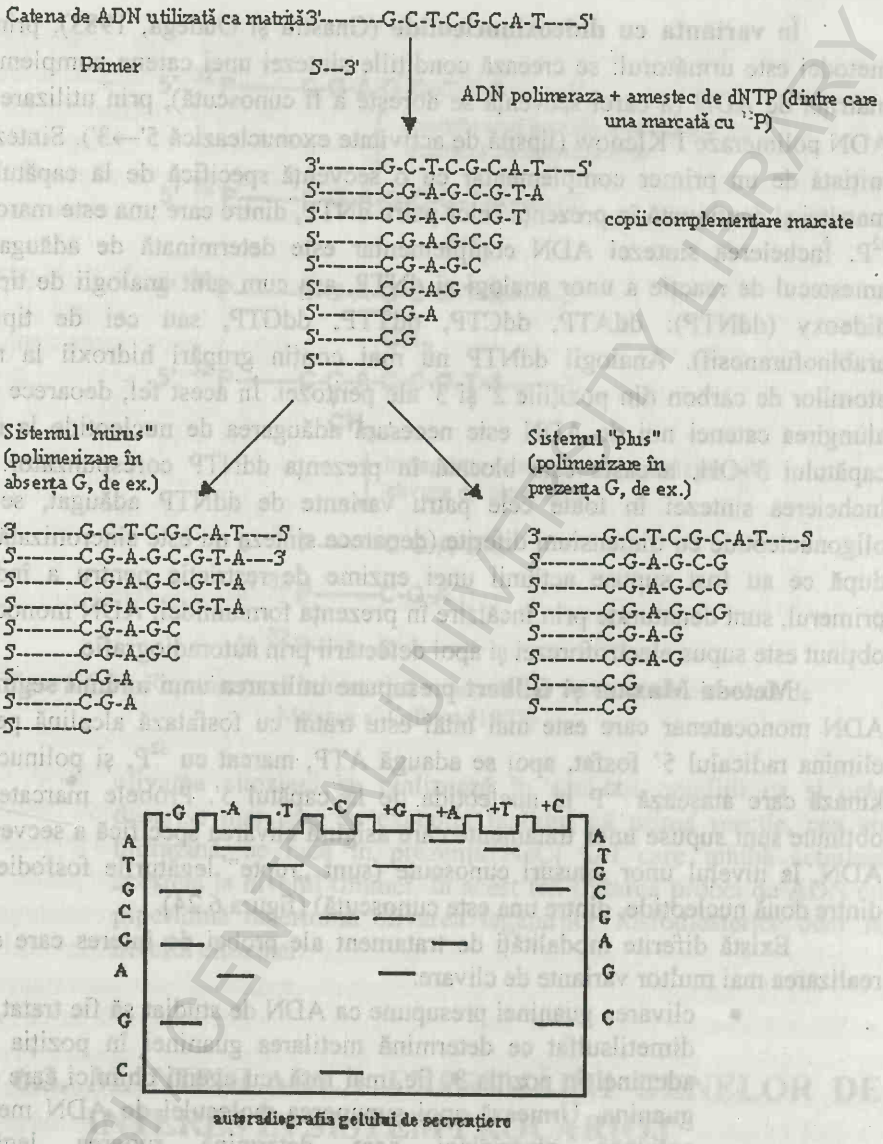


Figura 6.23. Determinarea secvenței de nucleotide a unui fragment de ADN prin utilizarea metodei "plus-minus" (după Gaastra și Oudega, 1983)

În cazul metodei "plus", amestecul de oligonucleotide marcate, obținute în prima etapă, este supus acțiunii ADN polimerazei de fag T4 care, datorită activității sale exonucleazice în sensul 3'-5', degradează ADN dublu catenar, începând cu capătul 3'. În plus, în amestecul de reacție este introdusă o anumită dNTP, astfel că acțiunea exonucleazică se oprește la nivelul nucleotidei care este prezentă în amestecul de incubare (figura 6.23).

CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În **varianta cu dideoxinucleotide** (Gaastra şi Oudega, 1983), principiul metodei este următorul: se creează condiţiile sintezei unei catene complementare matriţei de ADN (a cărei secvenţă se doreşte a fi cunoscută), prin utilizarea unei ADN polimeraze I Klenow (lipsită de activitate exonucleazică 5'→3'). Sinteza este iniţiată de un primer complementar cu o secvenţă specifică de la capătul 3' al matriţei şi continuată în prezenţa celor patru dNTP, dintre care una este marcată cu ^{32}P. Încheierea sintezei ADN complementar este determinată de adăugarea la amestecul de reacţie a unor analogi ai dNTP, aşa cum sunt analogii de tip 2'-3'-dideoxy (ddNTP): ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP, sau cei de tip β-D-arabinofuranosil). Analogii ddNTP nu mai conţin grupări hidroxil la nivelul atomilor de carbon din poziţiile 2' şi 3' ale pentozei. În acest fel, deoarece pentru alungirea catenei noi de ADN este necesară adăugarea de nucleotide la nivelul capătului 3'-OH, aceasta este blocată în prezenţa ddNTP corespunzător. După încheierea sintezei în toate cele patru variante de ddNTP adăugat, se obţin oligonucleotide cu dimensiuni diferite (deoarece sinteza nu este sincronizată) care, după ce au fost supuse acţiunii unei enzime de restricţie pentru a îndepărta primerul, sunt denaturate prin încălzire în prezenţa formamidei. ADN monocatenar obţinut este supus electroforezei şi apoi detectării prin autoradiografie.

Metoda Maxam şi Gilbert presupune utilizarea unui anumit segment de ADN monocatenar care este mai întâi este tratat cu fosfatază alcalină pentru a elimina radicalul 5' fosfat, apoi se adaugă ATP, marcat cu ^{32}P, şi polinucleotid-kinază care ataşează ^{32}P la nucleotida de la capătul 5'. Probele marcate astfel obţinute sunt supuse unor tratamente care asigură clivarea specifică a secvenţei de ADN, la nivelul unor situsuri cunoscute (sunt „rupte" legăturile fosfodiesterice dintre două nucleotide, dintre una este cunoscută) (figura 6.24).

Există diferite modalităţi de tratament ale probei de interes care asigură realizarea mai multor variante de clivare:

- clivarea guaninei presupune ca ADN de studiat să fie tratat, fie cu dimetilsulfat ce determină metilarea guaninei în poziţia 7 şi a adeninei în poziţia 3, fie, mai rară, cu agenţi chimici care distrug guanina. Urmează apoi supunerea moleculei de ADN metilat la acţiunea piperidinei care determină ruperea legăturilor fosfodiesterice alături de poziţia ocupată de guanină;
- clivarea guaninei-adeninei presupune tratarea ADN metilat cu dimetilsulfat cu piridin-formiat. Aceasta face ca tratarea ulterioară cu piperidină să determine clivarea legăturilor fosfodiesterice ori de câte ori în segmentul de ADN apare A sau G;
- clivarea timinei-citozinei presupune ca ADN de interes să fie mai întâi supus acţiunii hidrazinei care interacţionează specific cu timina şi citozina, iar apoi, amestecul obţinut, este tratat cu piperidină care clivează legăturile fosfodiesterice din secvenţa de ADN ori de câte ori apar nucleotidele de tip dTTP sau dCTP;

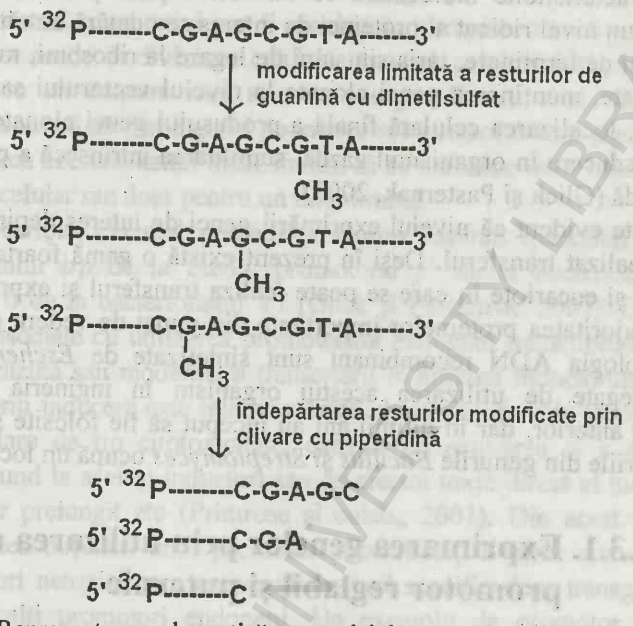


Figura 6.24. Reprezentarea schematică a metodei de secvențiere elaborată de Maxam și Gilbert (1977)

- clivarea citozinei se realizează în aceleași condiții ca și cele descrise mai sus, cu excepția faptului că prima reacție, cea cu hidrazină, se face în prezența NaCl 5M care inhibă acțiunea acesteia la nivelul timinei. În acest fel, tratarea probei de ADN cu piperidină determină clivarea legăturilor fosfodiesterice doar la nivelul citozinei.

6.3. MANIPULAREA EXPRIMĂRII GENELOR DE INTERES ÎN SISTEM PROCARIOT

Principalul obiectiv al clonării genelor pentru aplicații biotehnologice este exprimarea genelor clonate într-o gazdă corespunzătoare. Din păcate, introducerea unei gene de interes într-un vector de clonare nu asigură, în mod obligatoriu, exprimarea sa eficientă. Mai mult, în cazul aplicațiilor la nivel industrial este necesar ca proteina codificată de gena clonată să fie sintetizată cu o eficiență ridicată pentru a se obține cantități mari din respectivul produs. Pentru ca acest obiectiv sa fie realizat au fost elaborați o serie de vectori de exprimare specifici care conțin elementele genetice ce asigură controlul transcrierii, al traducerii, stabilitatea proteinei și secreția produsului genei clonate în mediul extracelular.

Printre caracteristicile moleculare ce au fost supuse prelucrării astfel încât să determine un nivel ridicat al proteinei de interes se numără următoarele: secvențele promotor și de terminare, tăria situsului de legare la ribosomi, numărul de copii al genei clonate, menținerea genei clonate la nivelul vectorului sau integrarea sa în cromosom, localizarea celulară finală a produsului genei clonate, eficiența procesului de traducere în organismul gazdă, stabilitatea intrinsecă a proteinei străine în celula gazdă (Glick și Pasternak, 2003).

Este evident că nivelul exprimării genei de interes depinde și de gazda în care s-a realizat transferul. Deși în prezent există o gamă foarte variată de gazde procariote și eucariote în care se poate realiza transferul și exprimarea genelor de interes, majoritatea proteinelor importante din punct de vedere comercial produse prin tehnologia ADN recombinant sunt sintetizate de *Escherichia coli*. Argumentele legate de utilizarea acestui organism în ingineria genetică au fost prezentate anterior, dar în ultimii ani au început să fie folosite și alte gazde, între care bacteriile din genurile *Bacillus* și *Streptomyces* ocupă un loc aparte.

6.3.1. Exprimarea genelor prin utilizarea unui promotor reglabil și puternic

Cel mai important factor de reglare a exprimării genelor la bacterii este frecvența inițierii transcrierii și deci producerea ARNm. Variațiile în ceea ce privește inițierea transcrierii se datorează faptului că genele au promotori diferiți, a căror "putere" variază. Puterea sau tăria unui promotor depinde de secvența de baze din regiunile Pribnow și –35, de distanța dintre ele și de natura bazelor din regiunea +1 și +10 (Vătafu și Cornea, 2001). Cu cât afinitatea acestor regiuni pentru ARN-polimerază este mai mare, cu atât promotorul este mai puternic. Un promotor puternic va asigura inițierea transcrierii cu frecvență mare, generându-se astfel mai multe molecule de ARNm și, în consecință, sintetizându-se cantități mai mari din proteina specifică. Promotorii slabi au acțiuni contrare (rata de inițiere a transcrierii este mică, iar cantitatea de proteină codificată este și ea foarte redusă). Cea mai studiată regiune promotor de la procariote este cea a operonului *lac* de la *E.coli* (promotorul *lac* = P_{lac}), ea fiind testată și pentru exprimarea unor gene heterologe. În cazul acestui promotor se cunoaște că el este inductibil, adică declanșează transcrierea genei de interes doar în prezența unui anumit semnal chimic (prezența în mediu a lactozei sau a unui analog al său, cum ar fi IPTG). La procariote există și promotori constitutivi care determină o exprimare continuă a genei pe care o controlează. In experimente efectuate, genele de interes au fost inserate în vectori de clonare sub controlul unor promotori variați, atât constitutivi cât și inductibili. Aparent, promotorii constitutivi puternici ar asigura sinteza de către celula gazdă a unor mari cantități din proteina de interes. Totuși, o rată înaltă și continuă a producerii unei anumite substanțe, codificate de o genă clonată, este deseori în detrimentul celulei gazdă deoarece determină o deturnare a energiei celulare de la realizarea funcțiilor celulare esențiale spre sinteza unor compuși

nespecifici. Mai mult, vectorii plasmidiali ce conţin genele de interes clonate sub controlul unor promotori constitutivi pot fi pierduţi în întregime sau doar parţial pe parcursul mai multor runde de diviziune celulară deoarece celulele fără plasmide pot creşte mai rapid, cu un consum mai mic de energie. Pentru a se depăşi acest inconvenient este necesară clonarea genei de interes sub controlul unui promotor care să asigure transcrierea acesteia astfel încât sinteza să se realizeze doar într-un anumit moment al ciclului celular sau doar pentru un timp limitat.

Pentru procariote, cei mai utilizaţi promotori naturali inductibil sunt P_{lac}, promotorul operonului *trp* de la *E.coli*, promotorul p^L de la bacteriofagul λ şi promotorul genei 10 de la bacteriofagul T7 (Glick şi Pasternak, 2003). Există însă unele dezavantaje asociate cu utilizarea promotorilor endogeni inductibili cum ar fi: determină o rată scăzută sau moderată a transcrierii în absenţa inductorului; nivelul stimulării obţinut prin inducere este relativ scăzută, de obicei de sub 10 ori; deseori apar efecte secundare de tip citotoxicitate, cauzate de activarea şi a altor gene endogene care răspund la aceiaşi inductori sau de efectul toxic direct al inductorului prin contact celular prelungit etc (Primrose şi colab., 2001). Din acest motiv s-a examinat posibilitatea obţinerii unor promotori recombinaţi a căror activare să fie realizată de inductori netoxici care activează în mod specific doar transgena şi nu interacţionează cu alţi promotori endogeni. Un exemplu de promotor inductibil recombinat este promotorul *tac* care include regiunea –10 a promotorului *lac* şi regiunea - 35 a promotorul *trp* separate printr-o secvenţă de 16 pb (de Boer şi colab., 1983). O variantă a acestui promotor hibrid este promotorul *trc* la care distanţa dintre cele două regiuni este de 17 pb. Atât promotorul *tac* cât şi *trc* pot fi induşi prin adăugarea IPTG în mediu (ca şi în cazul promotorului *lac*) dar s-a estimat că ei sunt de trei ori mai puternici comparativ cu promotorul *trp* şi de 10 ori mai eficienţi faţă de promotorul *lac*.

Un alt sistem promotor recombinat utilizat pentru exprimarea eficientă a genelor de interes în *Ecoli* este derivat de la p^L , promotor controlat de proteina represor cI a fagului λ. In acest caz se utilizează o variantă termosensibilă a represorului cI: celulele ce conţin acest represor mutant sunt crescute mai întâi la 28-30°C, temperaturi la care represorul blochează funcţionarea promotorului p^L . Dacă celulele sunt apoi cultivate la 42°C, represorul cI este inactivat (fiind termosensibil) iar transcrierea genei controlate de p^L se poate realiza (Mieschendahl şi Hill, 1985).

Eficienţa cu care un represor este inactivat iar transcrierea este declanşată depinde de raportul dintre numărul de molecule represor şi numărul de copii ale secvenţei promotor. Dacă la nivel celular există prea multe molecule represoare atunci este dificil să se activeze transcrierea, iar dacă numărul acestor molecule este prea mic (chiar dacă sunt mai multe decât numărul de copii de promotor), transcrierea se realizează chiar în absenţa inductorului. Menţinerea condiţiilor optime de funcţionare a genelor clonate se poate realiza în diferite moduri. Un exemplu ar fi acela al plasării genei pentru proteina represor şi a secvenţei promotor pe plasmide diferite care sunt menţinute într-un număr diferit de copii per celulă; în acest fel se păstrează raportul

corespunzător între cele două elemente reglatoare. De obicei, gena represoare este plasată pe o plasmidă cu un număr mic de copii per celulă (1-8 copii/celulă), iar gena de interes aflată sub controlul promotorului inductibil va fi clonată într-o plasmidă cu un număr mare de copii (30-100 copii/celulă). O variantă a acestui sistem este aceea a plasării genei reglatoare pe cromosom iar pentru obținerea unui număr suficient de molecule represoare se folosește o mutantă a genei reglatoare (de exemplu, mutanta *lacI*^{q} a genei reglatoare a operonului *lac* va asigura o cantitate suplimentară de represor care va împiedica transcrierea genei clonate în absența inductorului).

Majoritatea experimentelor de inginerie genetică se realizează la nivel de laborator, urmărind optimizarea condițiilor de transfer și de exprimare a genelor în diferite sisteme gazdă. Aceasta înseamnă utilizarea unor cantități mici de suspensie bacteriană (maxim 1-5l), condiții în care inducerea funcționării genelor clonate se realizează eficient fie prin modificarea temperaturii de cultivare (șocuri de temperatură) fie prin adăugarea unui inductor chimic. La nivel de instalații pilot (20-200l) sau la nivel industrial (cu bioreactoare cu volum mai mare de 200l) modificarea temperaturii se realizează în timp (30-60 minute) și necesită un consum suplimentar de energie, iar folosirea unui inductor chimic, așa cum este IPTG, este scumpă ceea ce face ca procesul de obținere a unei proteine heterologe de interes să fie neeconomic. Depășirea unor asemenea probleme se poate realiza prin diferite metode. Una dintre acestea este reprezentată de folosirea unui sistem bazat de două plasmide și a promotorului p^L: gena represor cI este plasată sub controlul promotorului *trp* pe o plasmidă cu număr mic de copii (figura 6.25), ceea ce previne acumularea unor cantități în exces de proteină represor, iar gena de interes este clonată pe o a doua plasmidă, sub controlul p^L. În sistemul prezentat, activarea promotorul *trp* se realizează în absența triptofanului din mediu astfel că proteina cI este sintetizată iar p^L este blocat. Adăugarea de triptofan în mediul de cultură determină blocarea sintezei represorului cI, astfel că gena aflată sub controlul p^L este exprimată.

Folosindu-se un asemenea sistem celulele bacteriene pot fi cultivate într-un mediu de cultură necostisitor, bazat pe melasă și hidrolizat de cazeină, suplimentat cu triptonă care conține suficient triptofan liber pentru a se realiza inducerea sintezei produsului genei clonate. In acest fel cantitatea de proteină de interes poate ajunge la 21-24% din proteinele totală sintetizată de celule (Mieschendahl și colab., 1986).

Deseori, scopul cercetărilor necesită utilizarea altor specii de bacterii Gram negative drept gazde pentru exprimarea genelor de interes ceea ce a ridicat probleme suplimentare. S-a dovedit că principiile generale aplicate pentru clonarea în *E.coli* sunt aceleași și în cazul altor bacterii Gram negative. Cu toate acestea, una dintre problemele majore pe care le ridică experimentele cu alte bacterii Gram negative este absența vector de exprimare specifici pentru scopul urmărit. Pentru a se „valorifica" experiența acumulată cu *E.coli*, cei mai mulți vectori pentru alte bacterii Gram negative sunt de tip navetă, având atât elemente din vectori pentru *E.coli*, bacterie în care ei se multiplică eficient, cât și elemente specifice gazdei în care se dorește în final transferul de gene și exprimarea acestora.

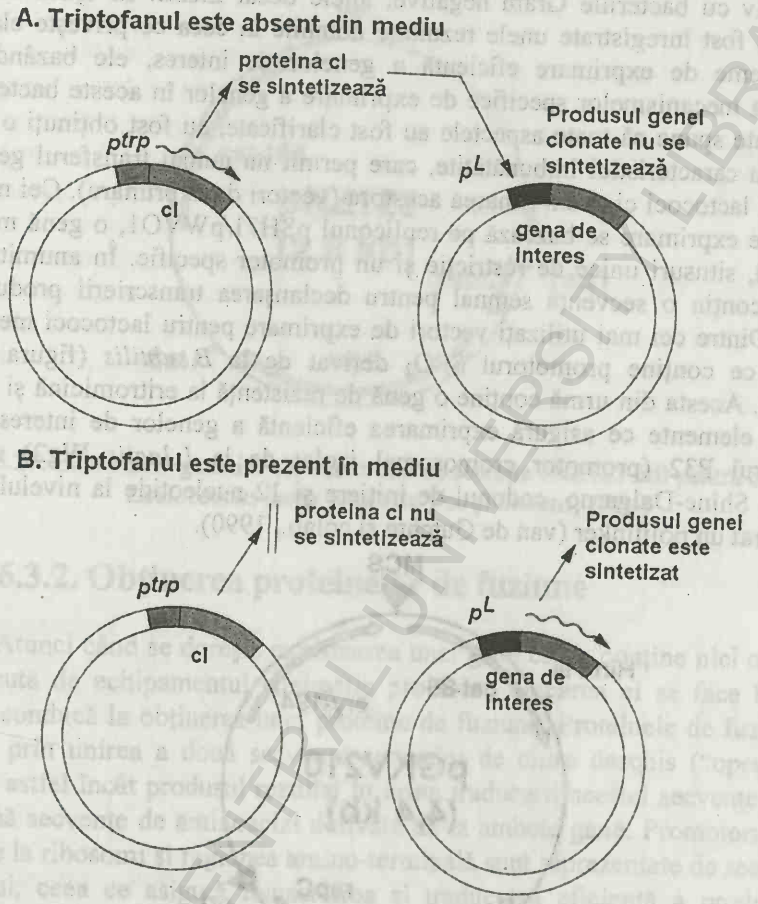


Figura 6.25. Reprezentarea schematică a modelului de clonare a genelor ce permite obținerea unor cantități mari de proteine de interes prin utilizarea p^L și a promotorului *trp* (după Glick și Pasternak, 2003)

Un exemplu de vector de exprimare capabil să funcționeze în mai multe gazde Gram negative se bazează pe unele secvențe din transpozonul Tn5, cunoscut că funcționează într-o gamă variată de specii bacteriene: astfel, se utilizează un fragment de 70pb provenit de la una dintre extremitățile repetate inversat ale transpoznului Tn5, secvență ce conține doi promotori independenți dar cu secvențe suprapuse care sunt necesari pentru transcrierea unor gene diferite ale Tn5. Clonarea unor gene marker, așa cum sunt β-galactozidaza sau cloramfenicol acetiltransferaza, sub controlul unei asemenea secvențe a conduse la exprimarea lor eficientă în diferite gazde Gram negative: *Alcaligenes sp., Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas stutzeri, P.fluorescens, Serratia marcescens* etc.

În cazul bacteriilor Gram pozitive rezultatele sunt şi mai puţine, comparativ cu bacteriile Gram negative, altele decât *E.coli*. În cazul bacteriilor lactice au fost înregistrate unele rezultate notabile în ceea ce priveşte elaborarea unor sisteme de exprimare eficientă a genelor de interes, ele bazându-se pe elucidarea mecanismelor specifice de exprimare a genelor în aceste bacterii. Deşi nu se poate spune că toate aspectele au fost clarificate, au fost obţinuţi o serie de vectori cu caracteristici îmbunătăţite, care permit nu numai transferul genelor de interes în lactococi ci şi exprimarea acestora (vectori de exprimare). Cei mai mulţi vectori de exprimare se bazează pe repliconul pSH71/pWVO1, o genă marker de rezistenţă, situsuri unice de restricţie şi un promotor specific. În anumite cazuri, vectorii conţin o secvenţă semnal pentru declanşarea transcrierii produsului de interes. Dintre cei mai utilizaţi vectori de exprimare pentru lactococi menţionăm: pGKV2 ce conţine promotorul SPO_2 derivat de la *B.subtilis* (figura 6.26) şi pMG36e. Acesta din urmă conţine o genă de rezistenţă la eritromicină şi în plus o serie de elemente ce asigură exprimarea eficientă a genelor de interes clonate: promotorul P32 (promotor cromosomal izolat de la *L.lactis* Wg2) urmat de secvenţa Shine-Dalgarno, codonul de iniţiere şi 12 nucleotide la nivelul cărora a fost inserat un polilinker (van de Gutchte şi colab., 1990).

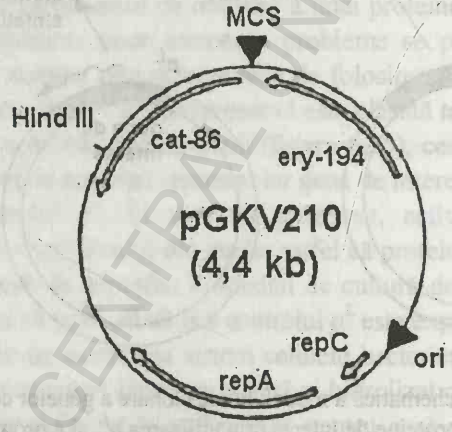


Figura 6.26. Reprezentarea schematică a vectorului de exprimare pGKV210) util pentru clonarea în *Lactococcus lactis* (după de Vos şi Simons, 1994)

Pe lângă vectorii de exprimare, pentru bacteriile lactice au fost obţinuţi şi o serie de vectori de secreţie (pNZ150, pNZ100, pNZ123 etc), care asigură eliminarea produsului genei clonate în mediul extracelular datorită existenţei la nivelul vectorului a elementelor genetice de reglare a secreţiei (sistem *sec*-dependent)(figura 6.27).

Folosirea unor asemenea vectori a permis clonarea, exprimarea şi secreţia în lactococi a unor proteine heterologe cum ar fi: pro-chimozina de origine bovină, β-lactamaza de la *E.coli*, α-amilaza de la *B.stearothermophilus* (gena *amyS*) sau de la *B.licheniformis* (gena *amyL)* etc (De Vos şi Simons, 1994).

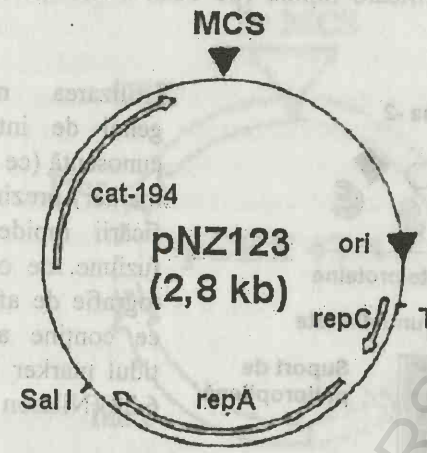


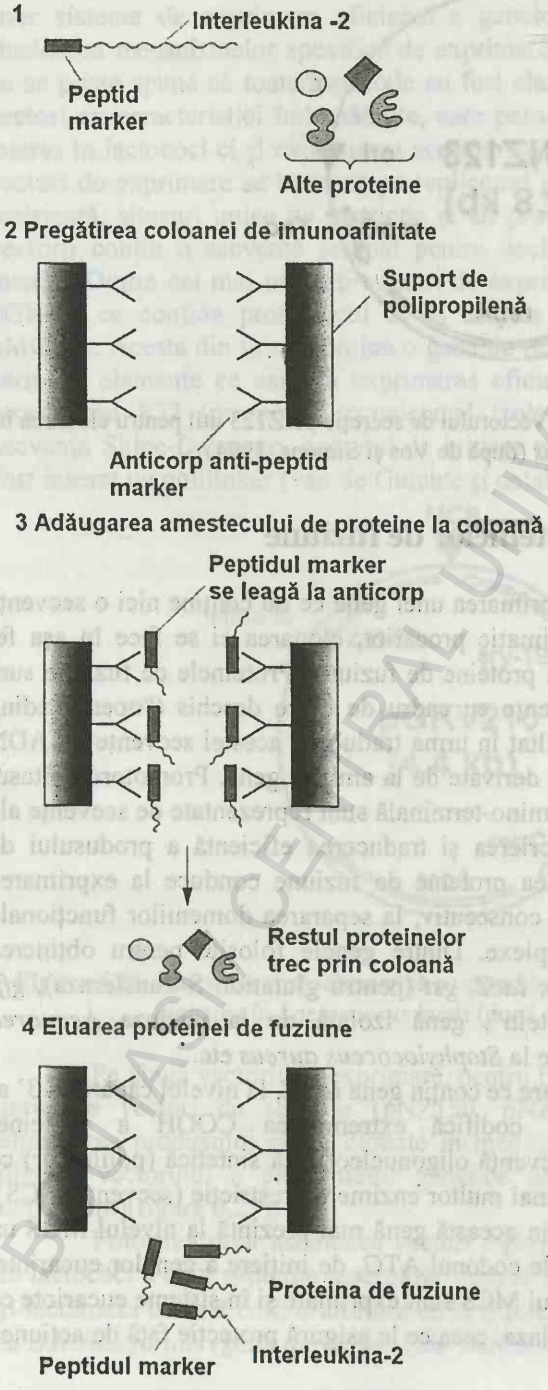
Figura 6.27. Elementele genetice ale vectorului de secreție pNZ123 util pentru clonarea în *Lactococcus lactis* (după de Vos și Simons, 1994)

6.3.2. Obținerea proteinelor de fuziune

Atunci când se dorește exprimarea unei gene ce nu conține nici o secvență recunoscută de echipamentul enzimatic procariot, clonarea ei se face în așa fel încât să conducă la obținerea unei proteine de fuziune. Proteinele de fuziune sunt obținute prin unirea a două secvențe cu cadru de citire deschis ("open reading frame"), astfel încât produsul rezultat în urma traducerii acestei secvențe de ADN să conțină secvențe de aminoacizi derivate de la ambele gene. Promotorul, situsul de legare la ribosomi și regiunea amino-terminală sunt reprezentate de secvențe ale vectorului, ceea ce asigură transcrierea și traducerea eficientă a produsului de fuziune. Producerea unor asemenea proteine de fuziune conduce la exprimarea unor fragmente scurte de gene și, consecutiv, la separarea domeniilor funcționale din interiorul unor proteine complexe. Dintre genele folosite pentru obținerea proteinelor de fuziune menționăm: *lacZ*, *gst* (pentru glutation S-transferaza), *gfp* (pentru "green fluorescence protein", genă izolată de la meduza *Aequorea victoria*), gena pentru proteina A de la *Staphylococcus aureus* etc.

În cazul vectorilor de clonare ce conțin gena *lac Z*, la nivelul capătului 3' al acesteia (deci în regiunea ce codifică extremitatea COOH a proteinei β-galactozidaza) s-a introdus o secvență oligonucleotidică sintetică (polilinker) ce conține situsul de recunoaștere al mai multor enzime de restricție (secvența MCS). De asemenea, unii vectori ce conțin această genă mai prezintă la nivelul MCS un situs Nco I (CCATGG) ce cuprinde codonul ATG, de inițiere a genelor eucariote. În acest fel, genele clonate la nivelul MCS sunt exprimate și în sisteme eucariote ca proteine de fuziune cu β-galactozidaza, ceea ce le asigură protecție față de acțiunea

proteazelor gazdei şi identificare rapidă (pe baza activităţii enzimei β-galactozidaza).



Utilizarea metodei fuziunii genei de interes cu o genă cunoscută (ce codifică un peptid marker) prezintă avantajul purificării rapide a proteinei de fuziune, de obicei prin cromatografie de afinitate pe coloană ce conţine anticorpi anti-peptidul marker imobilizaţi (figura 6.28)(Nilsson şi col., 1997).

Figura 6.28. Reprezentarea schematică a etapelor purificării unei proteine de fuziune prin cromatografie de afinitate

Unul dintre vectorii utilizaţi foarte frecvent pentru clonarea de gene în *E.coli* şi obţinerea de proteine de fuziune este pGEX 4T1 (fig.6.29). Acesta face parte dintr-o familie de vectori de tip GEX, diferenţele dintre ei fiind datorate fie situsurilor unice de restricţie de la nivelul MCS, fie situsului de recunoaştere pentru o protează specifică (pentru factorul Xa sau pentru trombină) plasat în faţa MCS.

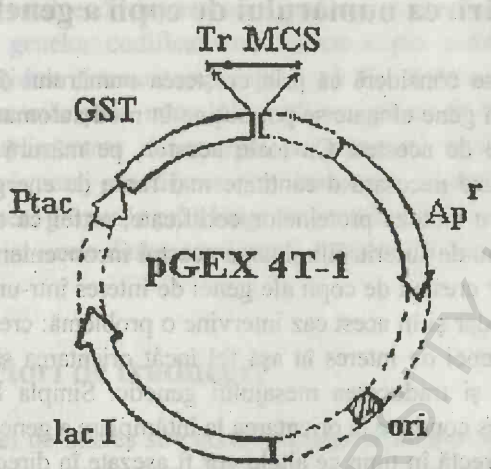


Figura 6.29. Reprezentarea schematică a plasmidei pGEX 4T-1

Aşa cum se observă în figura 6.29, vectorul pGEX 4T-1 conţine elementele genetice necesare funcţionării în *E.coli*: originea replicării de la pBR322, gena de rezistenţă la ampicilină (Ap^r), gena *lacI* ce controlează, prin represorul codificat, transcrierea genelor plasate sub controlul promotorului inductibil *tac* şi a operatorului *lac*. Gena *gst* ce codifică enzima glutation S-transferaza a fost izolată de la *Schistosoma japonicum* şi clonată sub controlul unor elemente genetice ce-i asigură o exprimare foarte eficientă. La extremitatea 3' a acestei gene se află regiunea MCS, la începutul căreia a fost introdusă o secvenţă ce codifică o succesiune de patru aminoacizi, reprezentând situsul de recunoaştere pentru o protează (factorul Xa, trombină = Tr sau o protează recombinată, în funcţie de varianta de vector). Această protează va asigura în final separarea produsului de interes de proteina GST (codificată de vector). Clonarea la nivelul MCS al unui vector de tip pGEX a unei gene heterologe determină sinteza unei proteine de fuziune (GST + proteina codificată de gena clonată). Această proteină de fuziune poate fi detectată prin tehnici imunologice (interacţiune specifică cu anticorpi anti-GST) sau prin tehnici biochimice (incubarea proteinei de fuziune cu un substrat cromogen = 1-cloro-2,4- dinitrobenzen, care sub acţiunea GST este convertit la un compus de culoare galbenă ce poate fi detectat şi măsurat colorimetric). Purificarea proteinei se realizează prin cromatografie de afinitate, prin trecerea lizatului celular pe o coloană de Sefaroza 4G, pe care s-a imobilizat glutation. Eluarea proteinei de fuziune se face în condiţii nedenaturante, utilizând glutation redus care asigură menţinerea funcţiilor proteinei de interes şi caracterul antigenic al acesteia. După purificare, proteina de fuziune este tratată cu proteaza corespunzătoare (în exemplul dat este vorba despre trombină) care clivează situsul de recunoaştere şi separă cele două proteine: GST şi proteina de interes.

6.3.3. Mărirea numărului de copii a genelor de interes

În general se consideră că prin creşterea numărului de copii ale vectorilor plasmidiali ce conţin gene clonate se pot obţine în mod automat cantităţi crescute din proteinele codificate de acestea. Cu toate acestea, pe măsură ce numărul de copii plasmidiale creşte este necesară o cantitate mai mare de energie pentru menţinerea plasmidelor şi pentru sinteza proteinelor codificate, astfel că activităţile metabolice normale ale gazdei au de suferit. Eliminarea acestui inconvenient se poate realiza prin clonarea unui număr crescut de copii ale genei de interes într-un vector de clonare cu număr mic de copii dar şi în acest caz intervine o problemă: crearea unei dispuneri în tandem a copiilor genei de interes în aşa fel încât orientarea să fie corectă pentru a asigura transcrierea şi traducerea mesajului genetic. Simpla legare „cap-la-cap" a secvenţelor de interes conduce la orientarea la întâmplare a genelor: unele copii se vor afla în orientarea corectă în timp ce altele vor fi aşezate în direcţie opusă astfel că nu vor putea fi exprimate. Prin utilizarea unor secvenţe adaptor s-ar putea obţine inserturi multiple cu aceeaşi orientare dar, din păcate, eficienţa unui asemenea procedeu este scăzută şi consumatoare de timp.

Dacă o genă este prelucrată astfel încât să prezinte la extremitatea 5' extensii de câte 3 nucleotide complementare cu extensii similare de la o altă genă din amestec, atunci se poate obţine o dispunere în tandem a acestora după ligare (figura 6.30). Mai mult, dacă o asemenea „construcţie" prezintă extensii 5' complementare cu extremităţile monocatenare ale unui vector de clonare, atunci această secvenţă complexă poate fi clonată obţinându-se un vector recombinat (Lee şi colab., 1984).

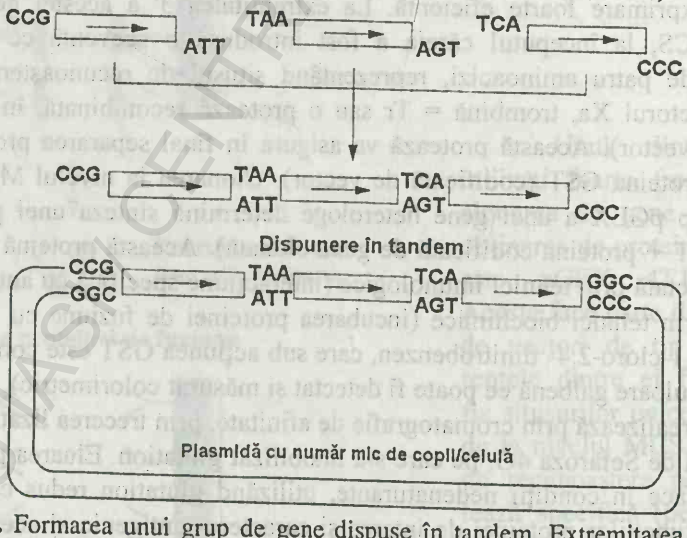


Figura 6.30. Formarea unui grup de gene dispuse în tandem. Extremitatea 5' a fiecărei gene este unică şi complementară cu o extremitate similară a altui fragment. Prin unirea pe bază de complementaritate a genelor între ele se formează un grup care poate fi inserat pe bază de complementaritate a extremităţilor într-un vector de clonare
(după Glick şi Pasternak., 2003)

Numeroase proteine de interes sunt produse pornindu-se de la grupuri în tandem ale copiilor genelor codificatoare, fiecare copie având semnalele corespunzătoare pentru inițierea și terminarea exprimării. Cu toate acestea, dacă un astfel de grup conține un număr prea mare de copii ale genei de interes atunci se vor consuma cantități suplimentare de energie pe parcursul replicării, transcrierii și traducerii respectivului mesaj genetic ceea ce conduce la cantități reduse de proteină de interes. De asemenea, grupurile prea lungi de gene în tandem sunt deseori instabile pe parcursul creșterii iar unele dintre copii pot fi excizate din vector și pierdute (Glick și Pasternak, 2003).

6.3.4. Vectori de traducere

Plasarea genei de interes sub controlul unui promotor puternic este esențială dar nu suficientă pentru exprimarea eficientă a acesteia și obținerea unor cantități corespunzătoare de produs. Pentru ca acest obiectiv să poată fi atins trebuie să existe o serie de alți factori care să permită nu numai o traducere eficientă ci și să asigure stabilitatea produsului codificat de gena clonată.

În celulele procariote nu toate proteinele codificate de genele normale sunt sintetizate cu aceeași eficiență, nivelul lor variind chiar dacă sunt codificate de același ARNm policistronic. Diferențele legate de eficiența traducerii și de reglarea transcripțională permit celulelor să conțină sute sau mii de copii ale unor anumite proteine sau, din contră, doar câteva copii în cazul altora. Variațiile de eficiență a traducerii unor gene se datorează prezenței unui semnal de inițiere a traducere reprezentat de situsul de legare la ribosomi la nivelul ARNm. Situsul de legare la ribosomi este alcătuit din 6-8 nucleotide (de exemplu: UAAGGAGG) care sunt complementare cu o secvență similară din ARNr 16S (cum ar fi secvența AUUCCUCC) aflat în subunitatea mică a ribosomilor. Cu cât legarea ARNm la ribosomi este mai puternică, cu atât este mai eficientă inițierea procesului de traducere. Din acest motiv, la *E.coli* au fost creați o serie de vectori de exprimare care asigură ca ARNm al genei de interes să conțină un situs de legare la ribosomi puternic. Pentru ca traducerea să fie realizată la un nivel corespunzător este necesar nu numai ca situsul de legare la ribosomi să fie prezent ci și ca el să se afle la o distanță corespunzătoare, precisă față de codonul de start al genei clonate (codonul AUG) iar ARNm să nu formeze structuri secundare care să-i împiedice accesul la ribosomi.

Un exemplu de vector de exprimare care întrunește condițiile menționate este vectorul pKK233-2 de la *E.coli* (Glick și Pasternak., 2003), el incluzând următoarele elemente:

- genă de rezistență la ampicilină ca marker de selecție
- promotorul *tac*
- situsul de legare la ribosomi al genei *lacZ*
- codonul start ATG localizat lao distanță de 8 nucleotide de situsul de legare la ribosomi

- secvențele de terminare T1 și T2 de la bacteriofagul λ
- situsuri unice de restricție pentru enzimele NcoI, PstI și HindIII) localizate între situsul de legare la ribosomi și secvențele de terminare.

Deși prezintă unele avantaje, un asemenea vector poate fi considerat drept un punct de plecare pentru obținerea unor vectori optimizați. Uneori traducerea poate fi limitată și de faptul că genele clonate în *E.coli*, fiind de origine diferită, pot conține codoni care sunt mai rar utilizați de noua gazdă (de exemplu: AGG, AGA, AUA, CUA sau CGA). Din acest motiv, în celulele de *E.coli* nu se vor sintetiza suficiente molecule de ARNt specifici pentru codonii rari, astfel că proteina codificată de gena clonată va fi sintetizată cu o rată mai mică sau vor apărea greșeli de încorporare a aminoacizilor. Depășirea acestei probleme se poate face prin utilizarea unor mutante de *E.coli* care sunt capabile să utilizeze eficient codonii rari și să permită în acest fel supraexprimarea proteinelor străine ale căror gene conțin asemenea codoni. De exemplu, utilizându-se o asemenea mutantă de *Ecoli* s-a reușit supraexprimarea genei pentru proteina Arah2, un alergen din arahide, obținându-se de aproximativ 100 de ori mai multă proteină decât în cazul folosirii unei tulpini bacteriene normale.

6.3.5. Creșterea stabilității proteinelor heterologe

În condiții normale de creștere, „durata de viață" a multor proteine variază de la câteva minute până la câteva ore. Diferențele înregistrate se datorează stabilității diferite a acestor proteine determinată fie de formarea unor punți disulfidice fie de prezența unor aminoacizi specifici la extremitatea amino a catenei polipeptidice (Kurokawa și colab., 2000). De exemplu, adăugarea anumitor aminoacizi la extremitatea amino a β-galactozidazei determină o creștere a stabilității proteinei de la 2 minute până la mai mult de 20 ore (tabelul 6.5).

Tabelul 6.5

Stabilitatea moleculelor de β-galactozidază ce conțin diferiți aminoacizi la capătul NH_2-terminal (după Bachmair și colab., 1986)

Aminoacizii adăugați	Durata de viață a proteinei
Met, Ser, Ala	>20h
Thr, Val, Gly	>20h
Ile, Glu	>30 min
Tyr, Gln	~10 min
Arg	~2 min

Uneori, prezența unui singur aminoacid suplimentar la capătul N-terminal al unei proteine heterologe este suficient pentru stabilizarea proteinei țintă, probabil deoarece îi asigură acesteia o mai mare rezistență față de acțiunea de degradare a proteazelor celulare. În acest fel, proteinele stabile se pot acumula în celule ceea ce are drept consecință creșterea cantității lor.

Cercetările efectuate asupra unui număr mare de proteine au evidențiat faptul că la nivelul acestora există anumite secvențe naturale de aminoacizi, notate secvențe PEST (Prolină, Acid glutamic, Serină și Treonină), care determină o sensibilitate crescută a respectivelor proteine la acțiunea proteazelor. De aceea, pentru creșterea stabilității unor asemenea proteine se poate interveni la nivelul genelor codificatoare prin alterarea regiunii ce codifică secvența PEST (Rogers și colab., 1986).

6.3.6. Împachetarea proteinelor

Cu toate avantajele și a progreselor înregistrate, clonarea în *E.coli* prezintă o serie de limite și dezavantaje ce țin în principal de incapacitatea prelucrării postranslaționale a proteinei străine (glicozilare, împachetare etc), mai ales dacă gena codificatoare este de tip eucariot, secreție ineficientă datorită formării corpilor de incluziune sau posibila contaminare a produsului de interes cu compuși toxici sau pirogeni proveniți din citoplasma bacteriei (datorită caracterului potențial patogen al tulpinilor de *E.coli*) (Baneyx, 1999).

Proteinele heterologe produse de tulpini recombinate de *E.coli* sunt deseori nefuncționale deoarece nu se realizează o împachetare corectă a acestora. Cercetările efectuate au permis stabilirea condițiilor de împachetare pentru numeroase tipuri de proteine dar nu există un protocol unic: unele molecule adoptă rapid conformația corectă în timp ce altele necesită condiții speciale. Parametrii de care trebuie să se țină seama pentru stabilirea condițiilor optime de împachetare sunt: temperatura de pliere, timpul necesar, concentrația proteinelor, valoarea pH și prezența unui co-solvent. Deseori plierea este datorată stabilirii unor punți disulfidice între anumite zone ale proteinei de interes. La *E.coli* și în cazul altor bacterii Gram negative, formarea punților disulfidice se realizează la nivelul spațiului periplasmic care poate fi considerat echivalentul topologic al reticulului endoplasmic de la eucariote. Formarea unor asemenea legături necesită prezența la nivelul spațiului periplasmic a două proteine periplasmice solubile (DsbA și DsbC) și a două proteine legate la membrană (DsbB și DsbD), ele determinând în final împachetarea corectă a proteinelor țintă. Dacă însă proteinele heterologe necesită stabilirea mai multor punți disulfidice (mai mult de trei) atunci împachetarea nu se mai realizează corect iar proteinele străine formează corpi de incluziune insolubili. Pentru eliminarea acestui eveniment nedorit se utilizează diverși agenți de solubilizare a proteine inactive: agenți de denaturare (uree, anumiți detergenți, guanidină-HCl) sau agenți reducători (β-mercaptoetanol, ditiotreitol), care împiedică formarea punților disulfidice la nivelul proteinelor de interes. Deseori, împachetarea corectă a proteinei de interes după solubilizarea ei din corpii de incluziune este asigurată prin inducerea formării de punți disulfidice prin utilizarea anumitor ioni metalici (Cornea, 2002).

Un alt aspect nedorit ce poate apărea în cursul exprimării genelor clonate este formarea de agregate macromoleculare ca urmare a interacțiunilor dintre porțiunile hidrofobe ale proteinelor împachetate greșit sau parțial. Fenomenul poate fi redus prin scăderea amestecului de reîmpachetare sau prin utilizarea unor co-solvenți stabilizatori (de exemplu, a argininei).

De asemenea, o cale alternativă de a obține cantități mari de proteine heterologe prin clonare în *E.coli* este aceea a utilizării secvențelor „leader" care asigură secreția proteinei de interes în spațiul periplasmic. La nivelul spațiului periplasmic există o serie de enzime specifice și chiar de proteine de tip „chaperone" („chaperonine-like") care pot contribui, în condițiile oxidante proprii acestui spațiu, la plierea corectă a proteinelor de interes. Dintre secvențele „leader" ce se utilizează în prezent menționăm secvența „leader" a genei *pelB* (pentru pectat liază) de la *Erwinia carotovora* și secvența similară de la gena ce codifică fosfataza alcalină. Aceste secvențe sunt recunoscute și clivate la nivelul spațiului periplasmic de anumite peptidaze specifice.

6.3.7. Limitarea oxigenului

E.coli, ca de altfel majoritatea microorganismelor utilizate drept gazde pentru experimentele de inginerie genetică sunt aerobe, necesitând prezența oxigenului pentru dezvoltare. Din păcate oxigenul prezintă o solubilitate scăzută în mediilor apoase astfel că, pe măsură ce densitatea celulară într-un mediu crește, concentrația de oxigen dizolvat scade iar creșterea celulară este încetinită sau chiar stopată. În anumite situații corectarea acestei probleme nu se poate realiza prin aerare puternică, prin agitarea culturii sau prin adăugarea de mediu proaspăt, iar scăderea concentrației de oxigen disponibil conduce la trecerea celulelor în faza staționară, moment în care au loc schimbări metabolice semnificative, inclusiv sinteza și eliberarea de proteaze care pot degrada proteinele heterologe sintetizate anterior (în faza exponențială de creștere).

O cale posibilă de stabilizare a proteinelor străine sintetizate de tulpinile recombinate de *E.coli* în condițiile de cultivare la nivel industrial este de a utiliza gazde mutante, deficiente în producerea de proteaze. Cu toate acestea obținerea unor mutante de acest tip este destul de complicată deoarece, în general, tulpinile incapabile de a produce proteaze cresc mai greu și sunt mai sensibile la factorii de mediu, ceea ce conduce la alte inconveniente. Din acest motiv, cercetările privind selectarea unor mutante deficiente în sinteza doar a anumitor proteaze continuă, până în prezent nefiind obținute rezultate aplicabile la scară industrială.

O altă posibilitate de a depăși inconvenientul legat de limitarea oxigenului din mediul de cultură este utilizarea unor tulpini bacteriene modificate genetic, capabile de a sintetiza o proteină bacteriană similară hemoglobinei, codificată de o genă provenită de la bacterii din genul *Vitreoscilla* (bacterii Gram negative aerobe, ce cresc în mod normal în medii foarte sărace în oxigen). Prezența proteinei bacteriene de tip hemoglobină în celulele recombinate de *E.coli* a determinat un nivel ridicat al sintezei de proteine, inclusiv a celor heterologe, o rată mai ridicată de producere a ATP și o cantitate mai mare de ATP celular chiar în condițiile unor concentrații scăzute ale oxigenului în mediul de cultură. Pentru ca o asemenea strategie să fie eficientă și în alte sisteme bacteriene este necesar ca celulele gazdă respective să exprime nu numai gena ce codifică proteina de tip hemoglobină de la *Vitreoscilla* ci să fie capabile să producă și porțiunea hem necesară asamblării proteinei de tip hemoglobină și obținerii formei funcționale a acesteia.

6.3.8. Stabilizarea genelor clonate prin integrarea în ADN cromozomal al gazdei

Așa cum s-a menționat deja, clonarea de gene la nivelul unor vectori cu număr mare de copii conduce la un consum energetic suplimentar din partea celulei gazdă, energie necesară pentru replicare, transcriere și traducerea informației genetice de interes. Din acest motiv, celulele gazdă pierd plasmidele recombinate, ele devenind capabile să crească mai rapid comparativ cu cele cu plasmide, iar după mai multe generații în populația bacteriană domină celulele fără plasmide ceea ce determină o scădere semnificativă a nivelului produsului genei clonate de interes. La nivel de laborator pierderea plasmidelor recombinate poate fi prevenită prin menținerea celulelor recombinat sub o permanentă presiune selectivă realizată prin adăugarea în mediul de cultură a unui antibiotic față de care rezistența este asigurată de gene plasate plasmidial. Metoda nu este aplicabilă la scară industrială datorită costurilor ridicate cauzate nu numai de utilizarea antibioticului sau a unui alt metabolit selectiv ci și de necesitatea îndepărtării complete a acestora la finalul fermentației sau pe parcursul etapelor de prelucrare. De asemenea, atunci când este vorba de microorganisme recombinate ce pot fi eliberate în mediu, prezența unui marker selectiv de tip genă de rezistență la antibiotice constituie un inconvenient legat de siguranța pentru mediu a respectivelor celule (posibila răspândire a unor gene nedorite la microorganismele naturale). Din aceste motive, introducerea genei de interes direct în cromosomul bacterian constituie o cale eficientă ce ar putea asigura o stabilitate ridicată a genei, menținerea ei pe parcursul a numeroase generații celulare și reducerea riscului de transfer la alte microorganisme din mediu.

Pentru ca ADN de interes să se integreze direct în cromosomul bacterian este necesar ca el să existe la nivelul unui vector de clonare specific și, în plus să prezinte un anumit grad de omologie (de obicei de cel puțin 50 nucleotide) cu o secvență din cromosom. În general, protocolul de realizare a integrării genei clonate în ADN cromosomal presupune mai multe etape (figura 6.31):

- identificarea situsului cromosomal de integrare adică a segmentului de ADN cromosomal al gazdei care poate fi întrerup fără ca funcțiile normale ale celulei să fie afectate;
- izolarea și clonarea într-un vector care nu se poate multiplica în celula gazdă a unei părți a situsului cromosomal de integrare;
- legarea genei clonate de un promotor reglabil plasat fie în interiorul fie alături de situsul cromosomal de integrare;
- transferul construcției obținute (vectorul recombinant) într-o gazdă corespunzătoare;
- selectarea și multiplicarea celulelor gazdă ce exprimă gena clonată integrată în cromozom.

B.C.U. „M. Kogălniceanu" IAȘI CHIMIE

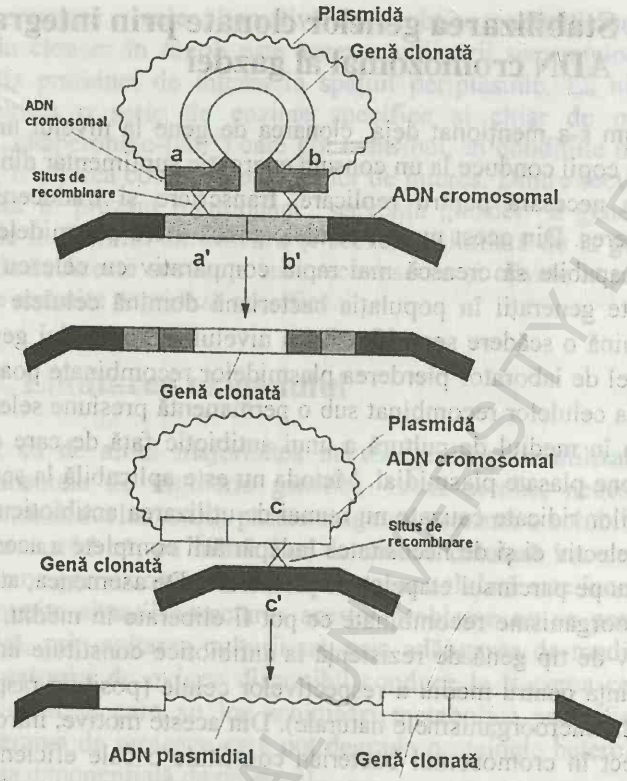


Figura 6.31. Etapele protocolului de integrare cromosomală a unei gene clonate. A. Gena clonată a fost inserată în vectorul plasmidial în interiorul situsului cromosomal de integrare aflat in plasmidă. B. Gena de interes este inserată în apropierea secvenței de integrare cromosomală (după Glick și Pasternak, 2003)

Atunci când celulele bacteriene gazdă sunt transformate cu un asemenea vector recombinant nereplicativ („sinucigaș") ele pot deveni capabile de a sintetiza produsul genei clonate doar dacă aceasta a fost integrată în cromosom pe parcursul unui proces de recombinare pe bază de omologie, proces catalizat de enzime ale celulei gazdă.

Cele mai multe experimente legate de introducerea genei de interes direct în cromosomul gazdei au fost efectuate la bacteriile din genul *Bacillus* (*B.subtilis, B.amyloliquefaciens*). Instabilitatea structurală a plasmidelor hibride introduse în *B.subtilis* reprezintă un fenomen ce se desfășoară cu o rată înaltă în aceste gazde, în absența presiunii selective. Instabilitatea plasmidelor hibride în *B.subtilis* ar putea fi explicată prin existența în acest organism a unor mecanisme foarte active și eficiente de recombinare la nivelul unor mici secvențe cu omologie limitată. In această situație apar destul de repede deleții, iar plasmidele rezultate (mai mici) devin preponderente în populația bacteriană. De aceea, pornind de la protocolul prezentat anterior, dacă vectorul de clonare conține secvențe de ADN care manifestă un anumit grad de omologie cu ADN cromosomal al noii gazde, se poate

produce un fenomen de recombinare între vector şi cromosom iar vectorul recombinat poate fi integrat complet sau doar parțial în cromosom, fenomen ce asigură o stabilitate mărită genelor de interes (Niaudet şi colab., 1985). În acest caz au fost obținuți vectori de clonare capabili de multiplicare în *E.coli* dar incapabili de replicare în *B.subtilis*, la nivelul cărora au fost inserate gene implicate în biosinteza enzimei α-amilaza, gene provenite de la *B.amyloliquefaciens*. Integrarea ADN de interes s-a realizat în interiorul situsului de recombinare plasat pe plasmidă iar constructul a fost introdus în *B.subtilis*. Celulele transformate selectate pe baza rezistenței la antibiotice codificate plasmidial au devenit capabile de a sintetiza α-amilaza în cantități mari, dovadă că gena codificatoare s-a integrat în cromosomul gazdei printr-un eveniment de recombinare în urma căruia întregul vector recombinat a fost integrat (Kallio şi colab., 1987). Mai mult, pornind de la un asemenea sistem se pot selecta celule bacteriene transformate la care s-au realizat în mod spontan fenomene de amplificare a genei clonate (în cazul exemplului dat, a genei pentru α-amilază). Pentru aceasta celulele bacteriene respective au fost cultivate în prezența cloramfenicolului, singurele care au supraviețuit fiind cele în care s-a realizat duplicarea ADN integrat, ele evidențiind în acelaşi timp şi un nivel ridicat al activității α-amilazice, comparativ cu celulele inițiale şi cu cele ce conțin gena de interes clonată într-un vector cu un număr mare de copii (Kallio şi colab., 1987).

Aşa cum s-a menționat deja, prezența unui marker selectabil alături de gena clonată permite identificarea rapidă a coloniilor recombinate în condiții de laborator. Cu toate acestea, prezența la un organism modificat genetic, destinat eliberării în mediu, a unei gene marker ce codifică rezistența la un anumit antibiotic constituie un inconvenient major şi o piedică în aprobarea utilizării practice a respectivului organism (de exemplu, pentru degradarea unor poluanți din mediu). Din acest motiv au fost examinate diferite posibilități de eliminare a genelor marker după ce acestea au fost inserate împreună cu genele de interes în cromosomul celulei gazdă. Deşi sistemele propuse până în prezent sunt încă supuse cercetărilor, în esență ele se bazează pe introducerea genei marker în vectorul de clonare astfel încât aceasta să fie flancată de secvențe de recunoaştere pentru anumite enzime. Prin acțiunea unor asemenea enzime, a căror funcționare este declanşată de semnale specifice, gena marker esteeliminată. Concret, Palmeros şi colab. (2000) au propus folosirea sistemului de recombinare Cre-*loxP* format din recombinaza Cre şi situsurile *loxP* formate din 34pb: gena marker ce trebuie eliminată este flancată de două situsuri *loxP*, iar gena ce codifică enzima Cre este clonată pe altă plasmidă sub controlul unor promotor inductibil reglat de represorul codificat de gena *lacI* (fig.6.32). Adăugarea IPTG în mediu determină activarea genei ce codifică enzima Cre iar prin acțiunea acesteia gena marker este eliminată (prin clivarea situsurilor *loxP*). După ce recombinaza Cre şi-a îndeplinit rolul, acțiunea sa este eliminată prin îndepărtarea plasmidei ce o codifică, aceasta conținând un replicon termosensibil (plasmida poate fi menținută prin incubarea bacteriilor la 30°C dar prin creşterea temperaturii la 37°C ea este eliminată).

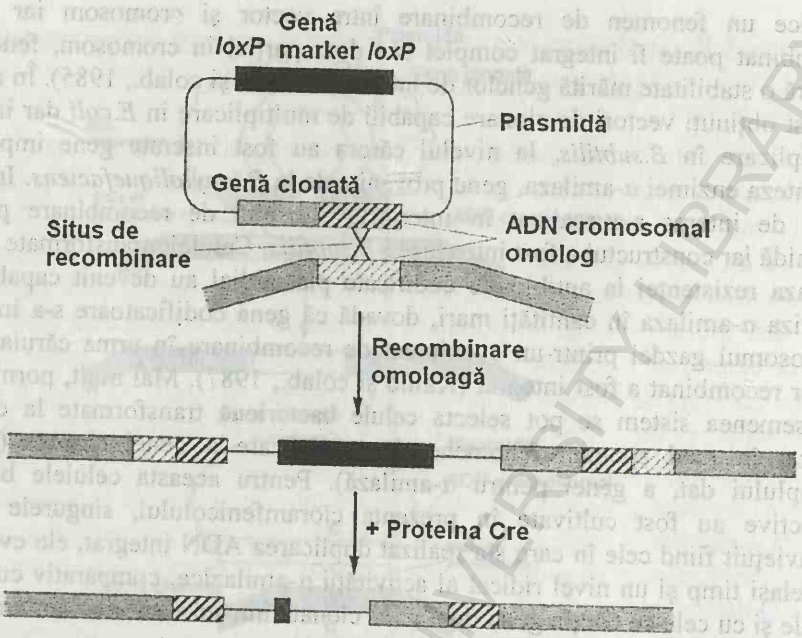


Figura 6.32. Model de îndepărtare a unei gene marker prin utilizarea sistemului Cre-*loxP*

6.3.9. Imbunătățirea secreției proteinelor heterologe

Particularitățile procesului de secreție a proteinelor la bacterii a fost prezentat la începutul acestui capitol evidențiindu-se faptul că există unele deosebiri între bacteriile Gram pozitive și cele Gram negative. Este clar că pentru proteinele heterologe sintetizate de bacteriile recombinate (modificate genetic) este foarte important ca ele să poată fi secretate în mediul extracelular sau în spațiul periplasmic, în cazul *E.coli* deoarece, în acest fel, purificarea lor este mai simplă și mai puțin costisitoare. De asemenea, în cazul unor proteine străine sintetizate de celule recombinate de *E.coli* stabilitatea lor este mai crescută în cazul în care sunt secretate (exportate) în spațiul periplasmic decât dacă sunt menținute în citoplasmă (de exemplu, în cazul preproinsulinei).

În cazul proteinelor heterologe secreția este asigurată, în principal, prin introducerea la nivelul genei codificatoare a unei secvențe de nucleotide ce determină sinteza peptidului semnal la extremitatea NH_2 a proteinei de interes. În anumite situații, simpla prezență a secvenței semnal nu asigură secreție eficientă, iar în cazul bacteriilor Gram negative secreția este limitată la spațiul periplasmic datorită existenței membranei externe. Inconvenientul poate fi depășit pe două căi posibile: pe de o parte pot fi folosite drept gazde bacterii Gram pozitive sau celule eucariote, iar pe de altă parte, pot fi prelucrate genetic unele tulpini de bacterii Gram negative astfel încât să devină capabile să elimine proteinele de interes în mediul extracelular.

Una dintre modalitățile eficiente de realizare a secreției unor proteine de interes (așa cum este interleukina-2) la *E.coli* este cea a obținerii unor proteine de fuziune formate din proteina străină și proteina de legare a maltozei împreună cu secvența semnal a acesteia (figura 6.33). Proteina de fuziune rezultată este eliminată în spațiul periplasmic de unde proteina de interes este separată prin tratare cu factorul Xa.

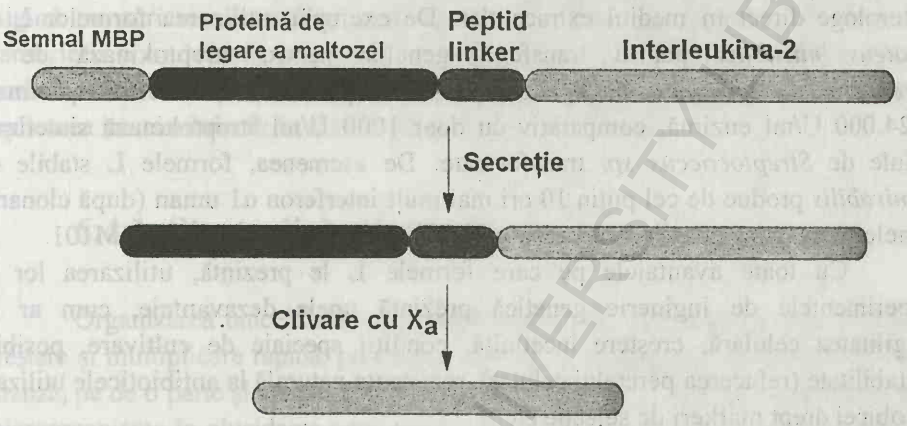


Figura 6.33. Reprezentarea schematică a modului de secreție a interleukinei-2 în celule de *E.coli* modificate genetic.

6.3.10. Utilizarea formelor L drept gazde pentru clonare

Optimizarea procesului de producere a proteinelor de interes constituie preocuparea permanentă a numeroși cercetători din domeniul biotehnologiei. O variantă propusă de unii cercetători (Kujau și colab., 1998) vizează utilizarea drept gazde pentru clonare a formelor L care reprezintă variante ale unor bacterii naturale capabile să supraviețuiască în absența prezenței peretelui celular. Formele L pot apărea în mod natural ca urmare a unor mutații la nivelul genelor implicate în sinteza peptidoglicanului dar ele pot fi induse fie prin tratament cu penicilină (care inhibă desfășurarea ultimelor etape ale procesului de biosinteză a peptidoglicanului) fie cu lizozim (degradează legăturile β-1,4 glicozidice dintre acidul N-acetil muramic și N-acetilglucozamina de la nivelul peptidoglicanului). Până în prezent au fost obținute atât forme L instabile (ce pot fi menținute doar atâta vreme ce în mediul de cultură există penicilină) cât și forme stabile (care nu mai prezintă nici un rest de perete celular și care nu îl pot regenera deoarece nu există o amorsă pentru desfășurarea sintezei). Diferența dintre formele L și sferoplaștii sau protoplaștii bacterieni constă în aceea că aceștia din urmă își por regenera peretele celular în anumite condiții de mediu, în timp de formele L stabile continuă să

crească, nu îşi refac peretele şi păstrează toate funcţiile metabolice ale bacteriilor din care s-au format.

Formele L pot fi transformate cu ADN de interes fie prin aplicarea metodei cu $CaCl_2$, prin electroporare sau prin incubare directă a celulelor cu ADN de interes şi polietileglicol. În cazul experimentelor efectuate cu asemenea celule s-a obţinut o exprimare crescută a genelor de interes şi o secreţie eficientă a proteinelor heterologe direct în mediul extracelular. De exemplu, utilizarea formelor L de *Proteus mirabilis* pentru transferul genelor pentru streptokinază de la *Streptococcus equisimilus* a dus la sinteza şi secreţia de către celulele transformate a 24.000 U/ml enzimă, comparativ cu doar 1000 U/ml streptokinază sintetizate celule de *Streptococcus sp.* transformate. De asemenea, formele L stabile de *P.mirabilis* produc de cel puţin 10 ori mai mult interferon α1 uman (după clonarea genelor corespunzătoare) comparativ cu celule transformate de *E.coli* JM101.

Cu toate avantajele pe care formele L le prezintă, utilizarea lor în experimentele de inginerie genetică prezintă unele dezavantaje, cum ar fi: fragilitatea celulară, creştere încetinită, condiţii speciale de cultivare, posibila instabilitate (refacerea peretelui celular), rezistenţa naturală la antibioticele utilizate de obicei drept markeri de selecţie etc.

6.4. MANIPULAREA EXPRIMĂRII GENELOR DE INTERES ÎN SISTEM EUCARIOT

Deşi cele mai multe experimente de transfer de gene de interes s-au realizat în sisteme procariote, inclusiv utilizând gene de origine eucariotă (ADNc), în numeroase situaţii s-a evidenţiat că proteinele eucariote sintetizate de bacterii manifestă instabilitate sau sunt lipsite de activitatea biologică specifică în special datorită absenţei mecanismelor specifice de împachetare sau a celor care asigură prelucrările posttranslaţionale corecte. Date fiind inconvenientele pe care le prezintă sistemul procariot, s-au efectuat cercetări intense privind stabilirea şi optimizarea unor sisteme eucariote de clonare prin utilizarea celulelor de drojdii, de insecte, de mamifere sau vegetale. În aceste situaţii proteinele heterologe de origine eucariotă pot suferi prelucrările corespunzătoare de tipul glicozilărilor, fosforilărilor, acetilărilor, acilărilor, sulfatărilor, γ-carboxilărilor, adăugării acizilor graşi de tip C14 sau C16 etc. Cercetările efectuate până în prezent cu diferite sisteme eucariote au evidenţiat faptul că nici una dintre gazdele eucariote utilizate nu este perfectă în privinţa prelucrărilor pe care le asigură proteinelor străine. De exemplu, unele gazde adaugă glucide neobişnuite la numite situsuri ale proteinei heterologe ceea ce conduce la o creştere a caracterului antigenic al acesteia sau la

pierderea proprietăților normale. Din acest motiv alegerea unui sistem de exprimare a genelor de interes depinde în primul rând de calitatea proteinei recombinate pe care o produce precum și de cantitatea acesteia sau de costurile de producție și de purificare.

În principiu sistemele eucariote nu diferă foarte mult de cele procariote: ele necesită existența unui vector de exprimare care să conțină secvența promotor ce asigură transcrierea corectă a genei de interes, semnalele eucariote de stopare a transcrierii și traducerii, o secvență care să permită poliadenilarea ARNm, o genă marker pentru selecția celulelor eucariote transformate, secvențe de origine pentru replicarea vectorului atât în *E.coli* cât și în gazda eucariotă.

6.4.1. Strategii de clonare în levuri

Organizarea unicelulară, ce conferă celulei de drojdie proprietăți cum ar fi: creștere și multiplicare rapidă, propagare clonală, posibilitate de marcare selectivă și analiză, pe de o parte și structura eucariotă, pe de altă parte, justifică utilizarea acestor microorganisme în elucidarea unor aspecte teoretice de biologie celulară, genetică și biochimie, în special a celor ce deosebesc celula eucariotă de cea procariotă. Astfel, drojdiile reprezintă modele experimentale de excepție, folosite în descifrarea structurii și sintezei acizilor nucleici, a reglajului genetic, a mecanismelor mutațiilor, reparării și recombinării, precum și în înțelegerea unor aspecte multiple referitoare la originea, evoluția, compoziția chimică, ultrastructura și rolul fiziologic al unor organite celulare la eucariote.

Importanța majoră a drojdiilor, în special a speciei *Saccharomyces cerevisiae,* constă în utilizarea lor industrială, în industria fermentativă tradițională (bere, vin, panificație). În ultimii ani, specii ale genurilor *Candida, Hansenula, Saccharomyces, Pichia* sunt utilizate cu succes în industria de sinteză proteică, pentru producerea de proteine furajere, cu perspective de utilizare și în hrana omului.

Aplicarea tehnologiei ADN recombinant la drojdii permite, pe de o parte, studiul structurii genelor eucariote și a mecanismului reglajului genetic la eucariote și, pe de altă parte, obținerea unor rezultate cu aplicații practice deosebite prin clonarea și exprimarea unor gene utile, heterologe. Dintre numeroasele specii de drojdii existente și utilizate în practică, cea mai studiată este specia *Saccharomyces cerevisiae* ("celebra" drojdie de bere). Pentru a se putea clona gene în această specie sunt necesari vectori de clonare specifici. Mulți dintre vectorii de clonare pentru drojdii sunt derivați de la o plasmidă naturală, plasmida de 2μm (6,3kb). Această plasmidă se găsește în nucleoplasmă, fiind capabilă de replicare autonomă, astfel că ea se poate găsi în aproximativ 50 de copii/celulă (figura 6.34).

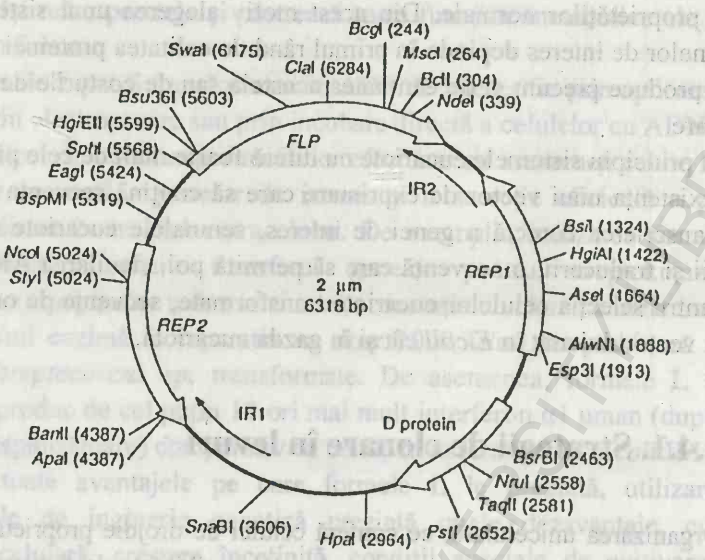


Figura 6.34. Reprezentarea schematică a plasmidei de 2µm de la *S.cerevisiae*

Sistemele de vectori pentru levuri sunt de trei tipuri, clasificarea făcându-se pe baza propagării ADN clonat după pătrunderea sa în celulele țintă:

- multiplicare autonomă, în număr mic de copii, stabilă, cu segregare corectă datorită existenței la nivelul vectorului a unor secvențe cromosomale, de tip centromer
- multiplicare autonomă, în număr mare de copii, instabile, cu segregare neregulată vectorii respectivi conținând originea replicării de la plasmida de 2µm
- multiplicare stabilă după integrarea în cromosomul gazdei prin recombinare pe bază de omologie (Botstein şi Fink, 1988).

Din acest punct de vedere, vectorii de clonare pentru drojdii pot fi încadrați în trei categorii: integrativi, episomali şi vectori bazați pe elemente cromosomale, ei putându-se replica atât în drojdii (excepție vectorii integrativi), cât şi în *E.coli* (sunt vectori de tip navetă)(tabelul 6.6).

Vectorii integrativi (YIp) sunt incapabili de replicare autonomă în celulele de drojdii, neavând elementele necesare replicării, dar se pot multiplica în celulele de *E.coli* (de unde sunt, de altfel, izolați). Ei pot fi folosiți pentru transformarea celulelor de drojdii, selecția clonelor transformate realizându-se pe baza unor gene de drojdii purtate de vector care sunt integrate, după recombinare, în genomul gazdei. Spre exemplu, vectorul YIp5 conține drept gena marker de selecție pentru drojdii gena *ura3,* ce codifică o enzimă necesară pentru biosinteza uracilului. Gena *ura3* poate realiza complementație genică şi în *E.coli*, la nivelul mutațiilor din gena *pyrF.*

Tabelul 6.6

Vectori de clonare pentru drojdii (adaptat după Ausubel și colab, 1995)

Plasmida	Dimensiuni	Secvența pentru replicare în *E.coli*	Secvențe pentru replicare în drojdii	Fenotip selectabil în *E.coli*	Fenotip selectabil în drojdii
YIp5	5541 pb	pMB1	-	Ap^r Tc^r $PyrF^+$	$Ura3^+$
YEp24	7769 pb	pMB1	2 μm	Ap^r Tc^r	$Ura3^+$
YRp7	5816 pb	pMB1	ARS1	Ap^r Tc^r $TrpC^+$	Trp^+
YCp50	7,95 kb	pMB1	ARS1	Ap^r Tc^r	$Ura3^+$
YLp21	55kb	-	ARS1	-	Trp^+ His^+
PYAC3	11,4 kb	pMB1	ARS1	Ap^r Tc^r $HisB^+$ $PyrF^+$ $TrpC^+$	$Ura3^+$ Trp^+ His^+
2 μm	6318 pb	-	2 μm	-	-

Vectorii episomali (YEp) conțin secvențe derivate din plasmida de 2 μm care îi permit replicarea autonomă în celulele de drojdii (tabelul 6.6). Aceste plasmide sunt utilizate foarte frecvent pentru clonare în drojdii, asigurând exprimarea eficientă a genelor clonate și propagarea stabilă în celulele fiice, rezultate atât prin mitoză cât și prin meioză.

Acești vectori se găsesc în număr mare de copii/celulă (50 exemplare/celulă) și au fost creați prin clonarea într-un vector integrativ a unui fragment din plasmida de 2μm: cel care poartă originea replicării și cele două secvențe repetate inversat. În cazul în care drept gazdă pentru noul vector se utilizează o tulpină de *S.cerevisiae* ce conține o plasmidă 2μm endogenă (așa cum este cazul majorității tulpinilor aparținând acestei specii), vectorii respectivi se pot amplifica deoarece plasmida endogenă, prin informația sa genetică furnizează proteinele FLP, REP1 și REP2, necesare amplificării plasmidei recombinate și distribuirii sale mai eficiente.

Unul dintre cele mai cunoscute exemple de vectori episomali este YEp24 (figura 6.35), vector de tip navetă între *E.coli* și *S.cerevisiae*.

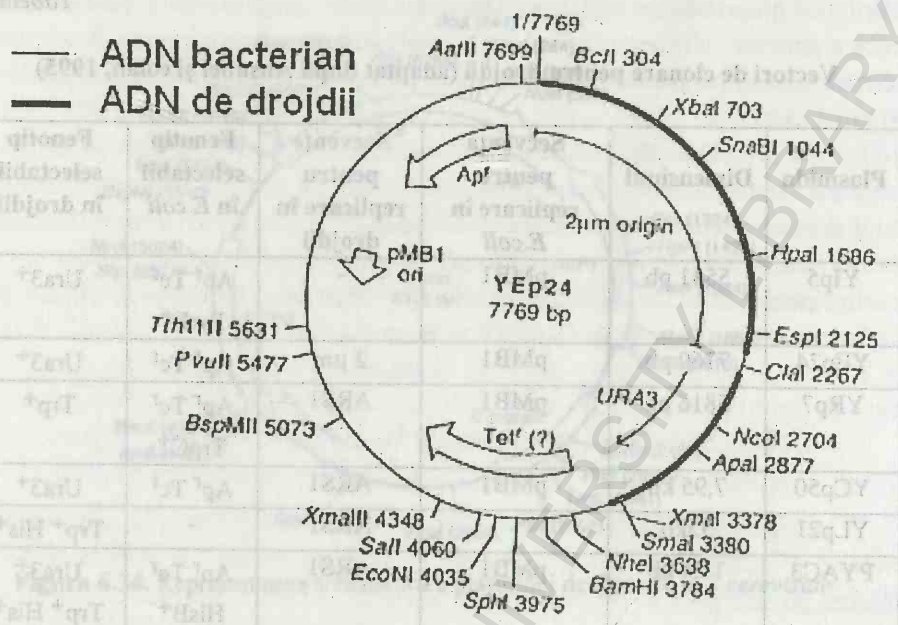


Figura 6.35. Harta genetică a plasmidei YEp24

Vectorii bazaţi pe elemente cromosomale sunt plasmide, capabile de replicare autonomă în drojdii, ei fiind de trei tipuri, în funcţie de elementele genetice pe care le conţin: vectori replicativi, vectori centromerici şi vectori lineari.

Vectorii replicativi (YRp) conţin secvenţe derivate din cromosomul drojdiilor (secvenţe ARS = "autonomous replication sequences"), care le asigură replicarea autonomă.

Aceste plasmide se găsesc în număr mare de copii/celulă (până la 100 copii), dar manifestă instabilitate în transferul la descendenţii rezultaţi prin diviziune celulară.

Vectorii centromerici (YCp) sunt asemănători celor replicativi dar, spre deosebire de aceştia conţin segmente derivate din regiunea centromerică (elementele CEN), ceea ce le asigură stabilitatea în cursul diviziunii mitotice sau meiotice. Deşi aflate în număr mic de copii/celulă (1-2 plasmide/celulă), vectorii centromerici sunt moşteniti stabil de celulele fiice, în cursul meiozei, ei comportându-se că adevăraţi cromosomi (minicromosomi).

Vectorii lineari (YLp) conţin la capetele moleculei anumite secvenţe bogate în G, repetate, care funcţionează că telomere şi permit plasmidelor respective să se replice ca molecule lineare. La drojdii, secvenţele telomerice sunt alcătuite din repetiţii în tandem a unor nucleotide: 5' ($dG_{1-3}dT$) 3'. De remarcat însă că, dacă asemenea vectori sunt de dimensiuni mici, ei manifestă instabilitate, segregând randomic în cursul meiozei.

Mărirea dimensiunilor plasmidelor lineare (5-100kb) este însoțită de micșorarea numărului de copii/celulă și de comportarea lor ca adevărați cromosomi (cromosomi artificiali). Din această categorie, cei mai cunoscuți sunt vectorii de tip YAC (figura 6.36), ei fiind utilizați pentru clonarea unor fragmente mari de ADN exogen.

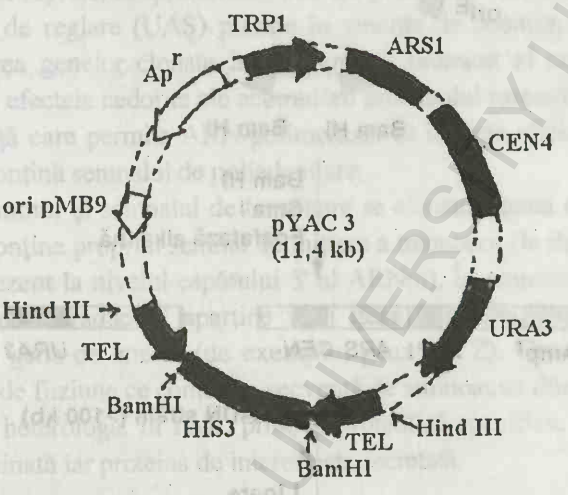


Figura 6.36. Harta genetică a plasmidei pYAC3

Plasmida pYAC3 se poate propaga sub forma circulară în celulele de *E.coli*, de unde poate fi ușor extrasă și utilizată pentru clonare, prin clivare simultană cu două enzime de restricție: Bam HI și Sna BI. La nivelul situsului Sna BI poate fi introdus ADN exogen, iar prin clivarea cu Bam HI se asigură linearizarea vectorului și funcționarea sa ca un minicromosom. Acesta se multiplică și se transmite stabil descendenței datorită secvențelor ARS, CEN și TEL pe care le conține.

Vectorii de tip YAC sunt utilizați frecvent pentru clonarea și apoi studierea secvențelor de ADN din diferite genomuri complexe, inclusiv din genomul uman (fragmente de 10-100 kb lungime) (figura 6.37).

Vectorii descriși mai sus permit clonarea de ADN exogen dar nu asigură exprimarea acestuia în drojdiile folosite drept gazde. Din acest motiv, au fost construiți vectori specifici ce asigură exprimarea genelor clonate.

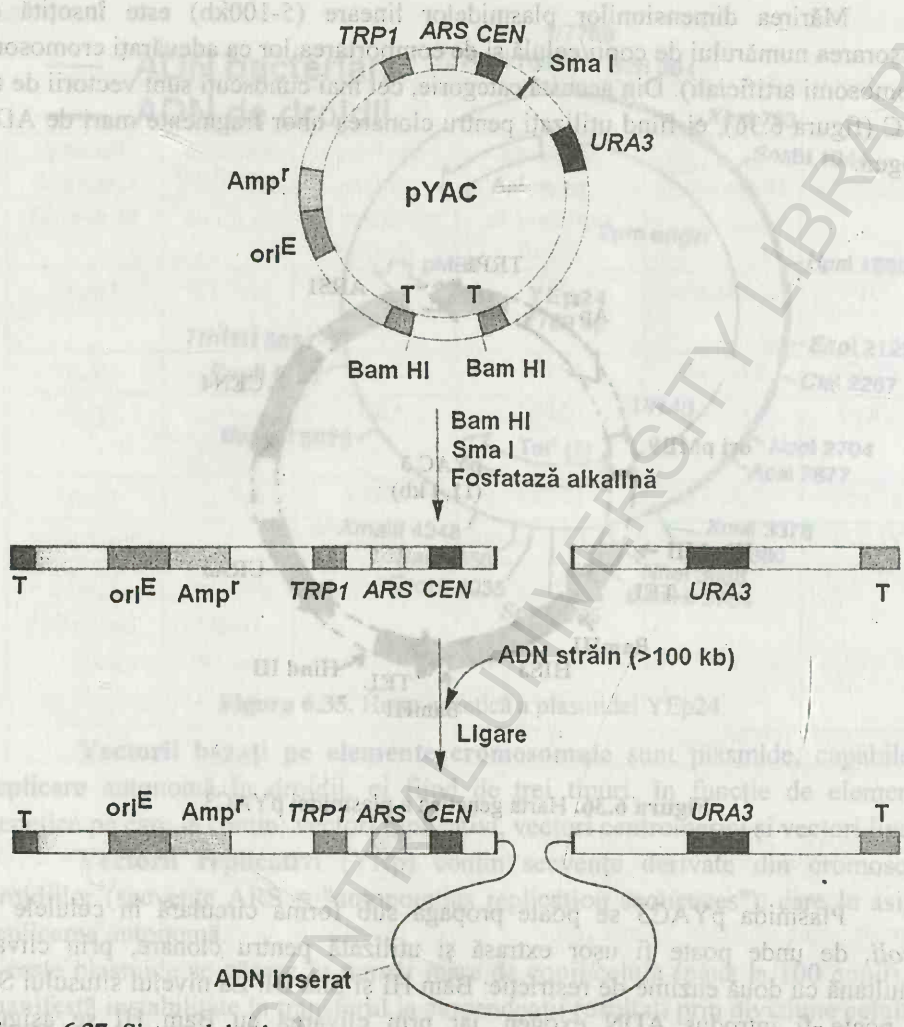


Figura 6.37. Sistemul de clonare a genelor de interes în vectori de tip YAC: ori^E = originea replicării pentru *E.coli*; ARS = secvența de replicare autonomă în drojdii, CEN = secvență centromerică, URA3 și TRP1 = gene marker pentru selecția celulelor de drojdii transformate (după clonare în drojdii dublu mutante, *ura3* și *trp1)*; T = secvențe telomerice; SmaI și BamHI = situsuri de clonare

Vectorii de exprimare pentru S.cerevisiae conțin:

- secvență promotor specifică pentru drojdii (de exemplu: promotorul inductibil GAL1 pentru galactokinază; promotorul constitutiv pentru alcool dehidrogenaza II (ADHI), promotorul inductibil pentru ADHII; promotorul constitutiv pentru 3-fosfoglicerat- kinaza (PGK) etc). Promotorii de drojdii diferă esențial de cei ai bacteriilor prin aceea că au secvențe activatoare și

diferă esențial de cei ai bacteriilor prin aceea că au secvențe activatoare și secvențe represoare, dispuse înaintea capătului 5' al secvenței start a transcrierii. Legarea proteinelor de control la secvențele activatoare duce la transcrierea genei respective, pe când legarea proteinelor de control negativ la secvențele represoare oprește transcrierea. De exemplu, promotorul ADH, de la gena pentru alcool dehidrogenază asigură sinteza unor cantități mari de enzimă, ce reprezintă aproximativ 5% din proteinele celulare;

- secvențe de reglare (UAS) plasate în amonte de promotor, care determină transcrierea genelor clonate într-un anumit moment al creșterii celulare și limitează efectele nedorite ale acumulării produsului respectiv;
- o secvență care permite ARN-polimerazei să încheie eficient transcrierea și care să conțină semnalul de poliadenilare;
- între promotor și semnalul de terminare se clonează gena de interes care, de obicei, conține propriul semnal de inițiere a traducerii (la drojdii este codonul AUG prezent la nivelul capătului 5' al ARNm). În anumite cazuri, semnalul de inițiere a traducerii aparține unei gene a gazdei, la nivelul căreia se clonează gena de interes (de exemplu, gena *lac Z*). Ceea ce rezultă este o proteină de fuziune ce conține o secvență de aminoacizi din proteina gazdei și proteina heterologă. În final, printr-o proteoliză specifică, secvența nedorită este eliminată iar proteina de interes este secretată.

În cazul multor experimente de clonare proteinele heterologe sunt menținute intracelular să fie produse intracelular. Unul dintre cele mai cunoscute exemple este cel al genei pentru enzima superoxid dismutaza umană (Cu/Zn-SOD), enzimă implicată în procesele de îndepărtare a ionului superoxid prin combinare cu un ion de hidrogen cu formare de apă oxigenată care, ulterior este degradată sub acțiunea catalazei sau a peroxidazelor. În ultima vreme enzima Cu/Zn-SOD este folosită ca agent terapeutic în bolile inflamatorii cum ar fi osteoartritele, artritele reumatoide, spondilite etc ceea ce înseamnă că în acest scop enzima trebuie să fie de tip uman pentru a fi eliminat eventualul răspuns imun nedorit (dacă enzima este de altă origine). Inițial ADNc pentru enzima Cu/Zn-SOD umană a fost clonată în *E.coli* dar proteina sintetizată în acest sistem prezenta unele modificări față forma umană. Clonarea aceleiași gene (ADNc) într-un vector derivat de la Yep, sub controlul promotorului constitutiv și a secvenței de terminare a genei pentru gliceraldehid-fosfat-dehidrogenaza (GAPDp și GAPDt) (figura 6.38) și introducerea în celule mutante de *S.cerevisie* (*leu2*) a permis obținerea intracelulară a unei cantități mari de enzimă care este identică cu forma naturală, produsă de celulele umane.

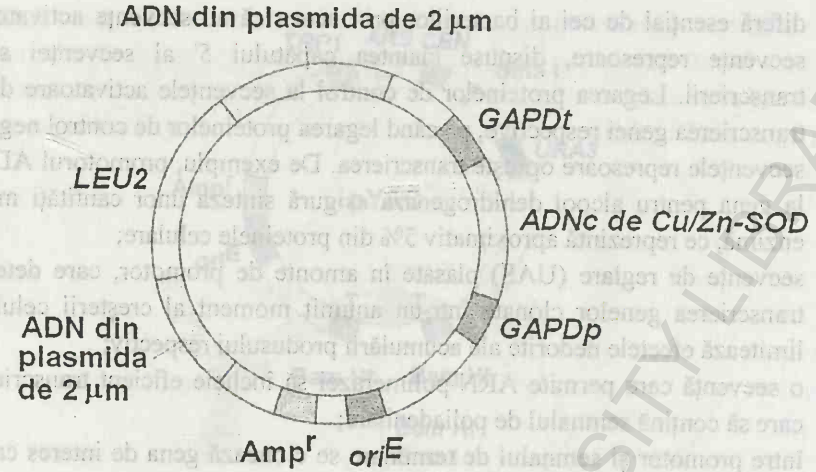


Figura 6.38. Vector de exprimare pentru *S.cerevisiae* care permite obținerea proteinei Cu/Zn-SOD de tip uman

Obținerea unor cantități mari de produs dorit, într-o formă cât mai pură și la un preț de cost cât mai mic necesită eliberarea acestor proteine în mediul de cultură. Deoarece *S.cerevisiaee* secretă un număr redus de proteine în mediul extracelular (mai puțin de 0,5%), prin eliberarea proteinelor heterologe se poate obține un grad mare de puritate al acestora astfel că nu sunt necesare tehnici complicate de purificare. De asemenea, secreția produce proteinelor o serie de modificări posttranslaționale, de tipul glicozilărilor sau acilărilor, care pot fi importante în cazul producerii proteinelor de la eucariotele superioare, în forma lor activă.

S-au folosit diferite secvențe "leader" pentru peptidele semnal ce asigură eliberarea proteinelor străine din drojdii, cel mai des utilizată fiind însă secvența pre-pro-leader a feromonului α, produsul genei MFα1. Factorul α este un peptid format din 13 resturi de aminoacizi care este eliberat în mediul de cultură de către celulele haploide α; el acționează pe receptori specifici aflați pe suprafața celulelor "a" și induce împerecherea acestora cu celulele α.

Secvențierea genei structurale pentru factorul α indică faptul că acest peptid este sintetizat inițial sub forma unui precursor de 165 resturi de aminoacizi, el fiind translocat în reticulul endoplasmatic unde este glicozilat. Precursorul este apoi transportat în aparatul Golgi unde are loc adăugarea unui lanț de carbohidrați și prelucrarea proteolitică succesivă a precursorului. In proteoliză sunt implicate trei proteaze dintre care proteaza codificată de gena KEX2 este cea mai importantă. Aceasta recunoaşte o secvență Lys-Arg care, de obicei se găsește în fața genei clonate. Precursorul proteic inițial conține semnalele de eliberare și situsurile de recunoaştere pentru enzimele implicate în prelucrarea factorului α. De aceea, pentru eliberarea proteinelor heterologe din drojdii s-au folosit semnalele de secreție și

situsurile de prelucrare proteolitică ale leaderului pre-pro-factorului α. În felul acesta s-a evidențiat o eliberare eficientă din drojdii a mai multor proteine de interes medical. Proteinele eliberate în acest fel sunt prelucrate eficient, cu legături disulfidice formate corect, sunt glicozilate și au capetele N-terminale identice cu cele ale proteinelor native.

Utilizarea *S.cerevisiae* în experimentele de inginerie genetică a permis exprimarea a numeroase proteine heterologe ale căror gene au fost clonate în acest sistem. Cu toate acestea, în anumite cazuri exprimarea este scăzută, cantitatea de proteină de interes recuperată este mică iar respectivele proteine sunt hiper-glicozilate prin adăugarea a mai mult de 100 resturi de manoză. Hiperglicozilarea poate altera funcțiile normale ale proteinelor de interes și poate stimula caracterul antigenic al acestora. De asemenea, atunci când concentrația celulele de *S.cerevisiae* atinge un anumit nivel, celulele încep să producă etanol care este toxic pentru celule (efectul Crabtree). Din aceste motive, în ultimii ani au fost testate și alte specii de drojdii pentru a fi utilizate în experimentele de inginerie genetică, dintre acestea cele mai multe au fost efectuate cu specia metilotrofă *Pichia pastoris* (Cregg, 1999). Specia menționată are unele avantaje comparativ cu *S.cerevisiae*:

- prezintă un promotor reglabil extrem de eficient – cel al genei metanol inductibile ce codifică sinteza alcool oxidazei (AOX1 = prima enzimă a căii de metabolizare a metanolului). În prezența metanolului, mai mult de 30% din totalul proteinelor celulare sunt reprezentate de alcool oxidază, iar în absența inductorului gena codificatoare pentru AOX1 nu funcționează. Aceasta înseamnă că prin utilizarea promotorului genei AOX1 pentru experimentele de clonare se poate maximiza producerea de proteină de interes în cursul fermentațiilor la nivel industrial;
- deoarece *P.pastoris* nu produce etanol se pot obține niveluri ridicate ale concentrației celulare și deci cantități mai mari din proteina dorită;
- *P.pastoris* secretă în mod normal foarte puține proteine ceea ce ușurează purificarea proteinelor heterologe care sunt eliminate în mediu (Wolf și colab., 2001).

Pentru clonarea genelor de interes în *P.pastoris* au fost elaborați vectori specifici care, în esență, conțin promotorul și secvența de terminare ale genei AOX1 sub controlul cărora sunt clonate genele de interes, originea replicării în *E.coli*, gene marker de selecție pentru bacterii (de exemplu gena de rezistență la ampicilină) și pentru drojdii (cum ar fi gena HIS4), acestea din urmă permițând selectarea rapidă a clonelor recombinate(figura 6.39).

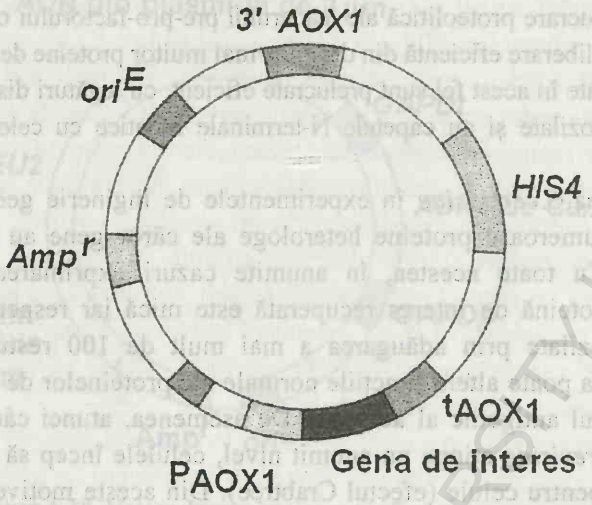


Figura 6.39. Reprezentarea schematică a unui vector de exprimare pentru *P.pastoris*

În plus, adăugarea secvenței semnal derivată de la gena pentru fosfataza PHO1 facilitează secreția proteinei de interes. De asemenea, majoritatea vectorilor de clonare pentru *P.pastoris* sunt vectori integrativi ceea ce previne instabilitatea plasmidelor recombinate pe parcursul cultivărilor îndelungate (Bretthauer şi Castellino, 1999). Utilizarea sistemului de exprimare a genelor străine în *P.pastoris* a permis producerea a peste 100 de proteine biologic active diferite originare din bacterii, fungi, necertebrate, plante şi mamifere, inclusiv proteine umane. Unele dintre acestea, aşa cum este antigenul de suprafață al virusului hepatitei B, albumina serică umană sau lizozimul bovin sunt identice cu proteinele native ceea ce permite utilizarea lor terapeutică (Glick şi Pasternak, 2003).

În afara proteinelor heterologe utile în terapie, prin utilizarea unor anumite specii de drojdii s-au putut obține şi alte tipuri de proteine cu utilizări industriale sau farmaceutice. De exemplu, cantități însemnate de hemoglobină A de tip uman au fost obținute în urma clonării ADNc corespunzător genelor codificatoare pentru catenele α şi β ale hemoglobinei într-un vector de exprimare specific pentru drojdia metilotrofă *Hansenula polymorpha*, sub controlul promotorului MOX, al genei pentru metanol oxidază (Gellisen şi colab., 1992). Alături de speciile menționate mai sus au mai fost realizate cercetări şi cu alte drojdii cum ar fi *Schizosaccharomyces pombe* sau *Candida utilis* dar rezultatele sunt mult mai puține.

6.4.2. Strategii de clonare în celule animale

Obținerea de animale transgenice care să manifeste proprietăți deosebite, importante din punct de vedere economic sau doar studierea structurii şi funcțiilor genelor de la aceste organisme presupune utilizarea „uneltelor" tehnologiei ADN

recombinant. De aceea, o condiție esențială a succesului experimentelor de introducere și, mai ales, de exprimare a unor fragmente de ADN exogen în celulele animale este aceea a existenței unor vectori de clonare adecvați.

Ca și în cazul celorlalte tipuri de organisme eucariote, vectorii de clonare pentru celulele animale sunt vectori de tip „navetă" care se multiplică, în mod obligatoriu și în celulele de *E.coli,* de unde pot fi izolați cu mare ușurință și utilizați în scopul dorit.

De aceea, asemenea vectori trebuie să conțină, în principiu, patru tipuri de componente:

- secvențe derivate din plasmide bacteriene care să le permită multiplicarea și selecția în celule bacteriene gazdă (*E.coli*);
- elemente genetice eucariote care să controleze inițierea transcrierii: secvența promotor și, eventual, secvențe activator („enhancer");
- secvențe de poliadenilare a ARNm (în cazul în care nu toți vectorii conțin introni care să asigure prelucrarea ARNm precursor);
- gene marker ce permit selecția celulelor animale ce conțin vectorul recombinat.

În privința promotorilor pentru exprimarea genelor de interes în celulele animale au fost examinate mai multe variante, între care promotorii endogeni inductibili ocupă un loc principal. Unul dintre primele exemple este promotorul genei pentru proteina de șoc termic *hsp70* („heat shock protein") de la *Drosophila melanogaster* a cărui funcționare este declanșată de creșterea temperaturii mediului la 37°C (Wurm și colab., 1986). Un alt tip de promotori sunt cei activați cu ahutorul unor semnale chimie. De exemplu, în celulele mamaliene numeroși promotori sunt activați de hormonii glucocorticoizi sau de analogi sintetici ai cestora. In experimente cei mai folosiți promotori mamalieni inductibili sunt promotorul genei pentru metalotioneina de la șoarece și promotorul LTR de la virusul murin ce determină apariția unor tumori mamare (MMTV). Promotorul genei pentru metalotioneină este activat atât de interferoni cât și de unele metale grele cum ar fi cadmiul și zincul ceea ce înseamnă că în cazul animalelor transgenice ce conțin o transgenă clonată sub controlul unui asemenea promotor, exprimarea acesteia poate fi declanșată prin adăugarea unei anumite concentrații de metal.

Utilizarea promotorilor inductibili prezintă unele dezavantaje cum ar fi: funcționarea chiar și în absența unui inductor specific; inducerea specifică redusă în anumite cazuri; fecte citotoxice cauzate de activarea și altor gene endogene ai căror promotori răspund la același inductor. Aceste dezavantaje pot fi depășite prin utilizarea unor sisteme recombinate. Un prim asemenea sistem a fost descris de Hu și Davidson (1987) este fiind reprezentat de utilizarea elementelor derivate de la gena *lacZ* de la *E.coli* și gena reglatoare *lacI*, aceasta din urmă fiind inserată sub controlul unui promotor LTR de la virusul sarcomului Rous (RSV). In aceste situații gena *lacZ* poate funcționa și în celule animale, ea fiind activată de prezența IPTG care blochează represorul produs de gena *lacI.*

Cele mai multe experimente de transfer de gene în celulele animale necesită selecția rapidă a clonelor recombinate prin utilizarea unor markeri adecvați („reporter genes"). cum ar fi gena *lacZ* de la *E.coli* (ce codifică pentru sinteza β-galactozidazei care hidrolizează β-D-galactopiranozidele)(Hall şi colab., 1983) sau gena *cat* (ce determină sinteza cloramfenicol acetil transferaza care asigură rezistența celulelor eucariote la cloramfenicol). Atât β-galactozidaza cât şi proteina CAT sunt proteine stabile care persistă în celulele care le exprimă, ele fiind astfel markeri foarte utili pentru evidențierea exprimării unor gene de interes. Cu toate acestea atunci când se urmăreşte inactivarea procesului de transcriere al unor gene de interes sau evidențierea unor schimbări rapide ale activității genice, asemenea markeri sunt mai puțin utili. De aceea, în 1986 a fost propus un nou marker, enzima luciferaza codificată de gena *luc* izolată de la licuriciul nord american *Photinus pyralis* (Ow şi colab., 1986). Enzima catalizează oxidarea substratului luciferină în prezența oxigenului, a ATP şi a ionilor de magneziu, reacția generând lumină. Sistemul respectiv a permis analizarea exprimării unor gene diferite în celule animale variate (Brandes şi colab., 1996).

Cel mai recent marker pentru studierea funcționării unor gene heterologe este proteina cu fluorescență verde (GFP) codificată de gena *gfp* izolată de la meduza *Aequoria victoria,* ea fiind studiată în mai multe tipuri de celule gazdă (Ellenberg şi colab., 1999). În afară de acesta, în ultimii ani au mai fost identificate şi alte proteine ce prezintă fluorescență variată, aşa cum este proteina cu fluroescență roşie de la *Anthozoa* care a fost utilizată cu succes pentru stabilirea modului de funcționare în timp al anumitor gene (Terskikh şi colab., 2000).

6.4.2.1. Clonarea în celule de insecte

Domeniile de aplicare a tehnologiei ADN recombinant s-au extins în cazul multor tipuri de organisme animale care au putea fi utilizate drept gazde pentru producerea de compuşi de interes. Acesta este cazul celulelor de insecte la care s-au înregistrat progrese importante în ceea ce priveşte cultivarea „in vitro" şi obținerea de vectori de clonare specifici. Astfel, este cunoscut faptul că celulele de insecte sunt sensibile la acțiunea unei categorii speciale de virusuri ce au primit denumirea de **baculovirusuri**. Acestea conțin un genom ADN de dimensiuni mari (128 kb) la nivelul căruia au fost identificare trei elemente majore: secvențe marginale repetate, un promotor puternic (promotorul PH) şi gena pe care o controlează (genă care codifică sinteza unei proteine numită polihedrină, ce se acumulează în celulele de insecte infectate viral)(figura 6.40).

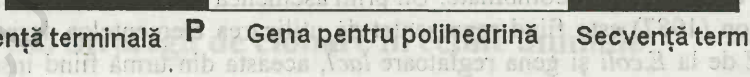


Figura 6.40. Reprezentarea schematică a componentelor genomului baculovirusurilor

De obicei, infecția virală la insecte determină formarea unor incluziuni celulare specifice, citoplasmatice sau nucleare, cu aspect poliedric sau granular, de

natură proteică (polihedrina). Incluziunile celulare pot conține unul sau mai mulți virioni; ele sunt liberate prin liza celulelor și pot contamina frunzele plantelor cu care se hrănesc larvele altor insecte. Incluziunile protejează virionii de căldură și de acțiunea altor agenți chimici; totuși, atunci când sunt ingerate de larve și ajung în tubul digestiv al acestora, ele se dizolvă și eliberează virionii care infectează celulele intestinului insectei.

Pornind de la aceste observații, au fost obținuți „in vitro" vectori plasmidiali hibrizi derivați de la baculovirusuri (bacmide) capabili de a se multiplica atât în *E.coli* cât și în celulele de insecte, care conțin o serie de secvențe ale genomului viral (de baculovirus), elementele reglatoare ale genei pentru polihedrină (promotorul și secvența de terminare) la nivelul cărora se introduc fragmentele de ADN de interes, precum și ale secvențe necesare selecției celulelor recombinate (figura 6.41). Baculovirusurile recombinate astfel obținute pot fi utilizate atât pentru obținerea unor cantități mari de proteine în celulele eucariote cât și pentru controlul invaziilor de insecte (Melcher, 2000).

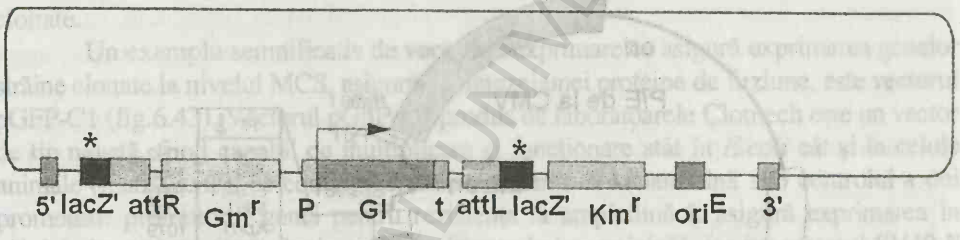


Figura 6.41. Bacmid recombinat ce conține o genă de interes (GI) clonată sub controlul secvențelor promotor (P) și de terminare (t) ale genei pentru polihedrină. Vectorul mai conține fragmente din gena *lacZ'*, secvențe necesare atașării, două gene marker de selecție (Gm^r și Km^r), precum și originea replicării în *E.coli* (ori^E)

Cercetările efectuate asupra unor specii de insecte, așa cum este *Trichoplusia ni* au arătat că larvele pot fi utilizate ca adevărate bioreactoare în scopul producerii unor proteine recombinate după infectarea lor cu baculovirusuri recombinante (van Beek și colab., 2003). Utilizarea unui asemenea sistem a permis obținerea unor cantități semnificative de proteine plasmatice, vaccinuri, anticorpi monoclonali, anticorpi recombinați, compuși de tip poliketide etc. De asemenea, culturile celulare de insecte, mai ales cele de lepidoptere, pot fi folosite în aceleași scopuri, existând o serie de informații furnizate de firme biotehnologice consacrate (de exemplu Invitrogen) conform cărora au fost obținute rezultate notabile în domeniul dezvoltării unor vaccinuri de interes (de exemplu, vaccin antigripal trivalent) (Glaser, 2003).

Cu toate avantajele pe care le au celulele de insecte în calitate de gazde pentru experimentele de clonare, în cazul multora dintre proteinelor heterologe ale căror gene au fost introduse în asemenea sistem prelucrarea precursorilor se face în mod incorect ceea ce conduce la forme inactive ale respectivelor proteine.

6.4.2.2. Clonarea în celulele mamaliene

Producerea de proteine heterologe de către celulele mamaliene constituie una dintre direcțiile majore de studiere a rolului fiziologic al unor proteine sau a modificărilor post-translaționale ale acestora. De aceea, numeroase firme specializate în comercializarea „uneltelor" necesare realizării tehnologiei ADN recombinant au comunicat realizarea unor vectori de exprimare utili pentru celulele mamaliene. De exemplu, în laboratoarele firmei Promega au fost obținute trei categorii de vectori de exprimare constitutivă a genelor clonate în celulele mamaliene: seria de vectori pSI, seria pCI şi seria pCI-neo. Diferența majoră dintre vectorii de tip pSI şi cei pCI constă în tipul de regiune enhancer/promotor ce controlează exprimarea genei inserate. Astfel, în cazul seriei pSI, aceştia conțin regiunea enhancer/promotor timpuriu de la virusul SV40, în timp ce vectorii din seria pCI conțin secvențele similare provenite de la citomegalovirusul uman (figura 6.42).

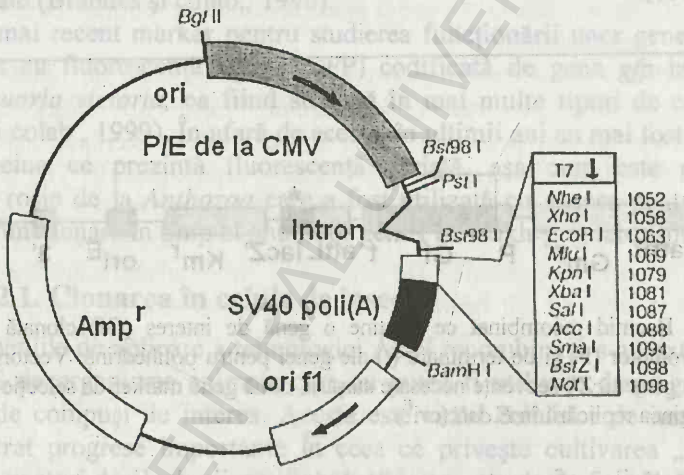


Figura 6.42. Harta genetică a vectorilor din seria pCI (catalog Promega, 1996).

Secvențele enhancer/promotor pe care le conțin vectorii menționați determină exprimarea puternică, constitutivă a genelor clonate într-o gamă variată de tipuri celulare. Mai mult, aşa cum se poate observa din fig.76, vectorii respectivi conțin un intron himeric, plasat în continuarea secvenței enhancer/promotor, intron compus din situsul de prelucrare post-transcripțională 5' provenit de la primul intron al genei pentru β-globina umană, fuzionat cu secvența 3' derivată de la intronul genei pentru regiunea variabilă a catenei grele a imunoglobulinei. Aceste două fragmente refac secvențele consens necesare procesului de „splicing" (prelucrare post-transcripțională a ARN premesager ce constă în eliminarea intronilor şi asamblarea exonilor). Intronul este plasat la extremitatea 5' a genei clonate (de obicei ADNc) având rolul de a preveni utilizarea unui posibil situs 5' de prelucrare din interiorul secvenței de interes. Studiile efectuate cu asemenea tipuri de vectori au arătat că prezența intronului măreşte nivelul de exprimare a

genei de interes: de exemplu, măreşte de 21 de ori nivelul exprimării genei de rezistenţă la antibiotic şi de 3 ori a genei clonate.

Vectorii menţionaţi mai conţin semnalele de poliadenilare, provenite de la SV40, care asigură terminarea transcrierii efectuată de ARN polimeraza II şi adăugarea ulterioară, la extremitatea 3' a ARNm sintetizat a 200-250 resturi de adenozină. „Coada" poliA rezultată măreşte stabilitatea ARN şi facilitează procesul de traducere.

Clonarea genelor în asemenea vectori se face la nivelul unui situs multiplu de clonare (MCS) ce conţine situsuri unice de recunoaştere pentru 11 enzime de restricţie, regiune flancată de promotorii virali T3 şi T7 care asigură transcrierea în *E.coli* a genei clonate pornind de la ambele extremităţi (prin copierea atât a catenei sens cât şi a celei antisens, în funcţie de ARN polimeraza folosită, ARN polimeraza de fag T7 sau de fag T3). În plus faţă de aceste regiuni, vectorii din seria pSI şi pCI mai conţin o genă de rezistenţă la ampicilină precum şi originea replicării de la fagul filamentos f1, fapt ce asigură, în anumite condiţii, obţinerea de ADN monocatenar util pentru determinarea secvenţei de nucleotide a genei de interes clonate.

Un exemplu semnificativ de vector de exprimare ce asigură exprimarea genelor străine clonate la nivelul MCS, asigurând sintezei unei proteine de fuziune, este vectorul pGFP-C1 (fig.6.43). Vectorul pGFP-C1 produs de laboratoarele Clontech este un vector de tip navetă, fiind capabil de multiplicare şi funcţionare atât în *E.coli* cât şi în celule animale (mamaliene). El conţine gena de rezistenţă la kanamicină sub controlul a doi promotori: promotorul genei pentru rezistenţa la ampicilină îi asigură exprimarea în celulele bacteriene (care devin astfel rezistente la kanamicină), iar promotorul SV40 îi asigură exprimarea în celulele eucariote.

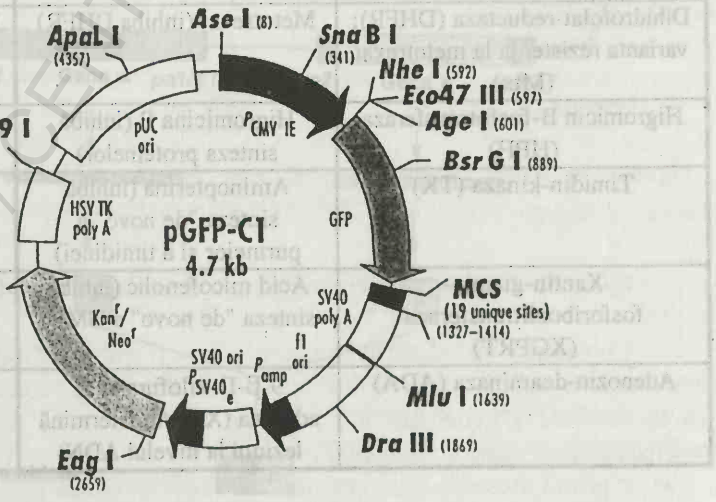


Figura 6.43. Harta genetică a plasmidei pGFP.C1

Specific pentru această plasmidă este faptul că ea conține gena *gfp*, ce codifică sinteza unei proteine cu fluorescență verde ("green fluorescence protein"), gena fiind izolată de la *Aequorea victoria* și clonată sub controlul promotorului pentru genele timpurii de la CMV ("cytomegalovirus") și a secvenței polyA de la SV40. Prezența secvenței MCS la capătul 5' al genei *gfp* permite clonarea ADN heterolog la acest nivel și, deci, obținerea unor proteine de fuziune specifice. Mai mult, vectorul conține și o regiune din fagul filamentos f1, ceea ce permite obținerea în *E.coli* a ADN monocatenar, utilizabil pentru secvențiere.

În experimentele de transfecție a celulelor mamaliene este necesar ca ADN exogen să conțină, pe lângă gena de interes, un marker de selecție pentru celulele transformate. Pentru selecția celulelor animale transformate se pot utiliza drept markeri genetici mai multe gene, cum ar fi: gena pentru aminoglicozid-fosfotransferaza (*aph*) (agentul de selecție este antibioticul G_{418} care inhibă sinteza proteinelor); gena pentru dihidrofolat-reductaza (*dhr*), care conferă rezistența la metotrexat; gena pentru higromicin-fosfotransferaza (*hpt*), care determină rezistența la higromicina B; gena pentru timidin-kinaza (implicată în sinteza timidin-trifosfatului = TTP), care determină rezistența la aminopterin (un agent inhibitor al sintezei purinei), etc (tabelul 6.7).

Tabelul 6.7.

Markeri dominanți de selecție utilizați în experimentele de transfecție a celulelor mamaliene (după Watson și colab., 1993)

Enzima	Agentul selectiv	Mecanismul selecției
Aminoglozid-fosfotransferaza (APH)	G_{418} (inhibă sinteza proteinelor)	APH inactivează G_{418}
Dihidrofolat-reductaza (DHFR); varianta rezistența la metotrexat (Mtx)	Metotrexat (inhiba DHFR)	Variantă de DHFR rezistentă la Mtx
Higromicin B-fosfotransferaza (HPH)	Higromicina B (inhibă sinteza proteinelor)	HPH inactivează higromicina B
Timidin-kinaza (TK)	Aminopterina (inhibă sinteza "de novo" a purinelor și a timidinei)	TK determină sinteza TTP
Xantin-guanin-fosforiboziltransferaza (XGPRT)	Acid micofenolic (inhibă sinteza "de novo" a GMP)	XGPRT determină sinteza GMP din xantină
Adenozin-deaminaza (ADA)	9-β-D-xilofuranozil adenina (Xyl-A: determină leziuni la nivelul ADN)	ADA inactivează Xyl-A

Pentru exprimarea genelor de interes în laborator au fost utilizate o serie de linii celulare, bine caracterizate: celule derivate din rinichi de maimuță verde (COS), din rinichi de pui de hamster (BHK), din rinichi de embrion uman (HEK-

239), celule din ovar de hamster chinezesc (CHO) etc. Primele trei categorii de linii celulare sunt folosite mai ales pentru exprimarea temporară (tranzitorie) a genelor de interes, pentru producerea rapidă a mici cantități de proteine heterologe sau pentru testarea integrității unui construct pe parcursul etapelor de dezvoltare ale vectorului.

În privința sistemelor de transfecție a celulelor mamaliene cu vectorii recombinanți, au fost propuse mai multe variante ce țin cont de forma în care se găsește proteina de interes (formată dintr-o singură catenă polipeptidică sau din mai multe). Astfel, cele mai multe sisteme de exprimare a genelor conțin o singură genă de interes care codifică sinteza unei catene polipeptidice, în timp ce forma activă a proteinei de interes este multimerică. De exemplu, hormonul tireostimulator uman este un heterodimer iar hemoglobina umană sau unii anticorpi sunt proteine tetramere. Experimentele efectuate până în prezent au arătat că utilizarea sistemului clasic de clonare a genelor codificatoare în vectori de exprimare separați poate conduce la o asamblare ulterioară incorectă a monomerilor, astfel că proteina rezultată este lipsită de activitate. De aceea s-au propus sisteme alternative, cum ar fi: introducerea simultană în aceeași celulă gazdă a doi vectori ce conțin genele de interes (ce codifică monomerii unei heteroproteine); clonarea în același vector a ambelor gene de interes sun controlul unor elemente reglatoare specifice (figura 6.44) sau utilizarea vectorilor bicistronici (figura 6.45).

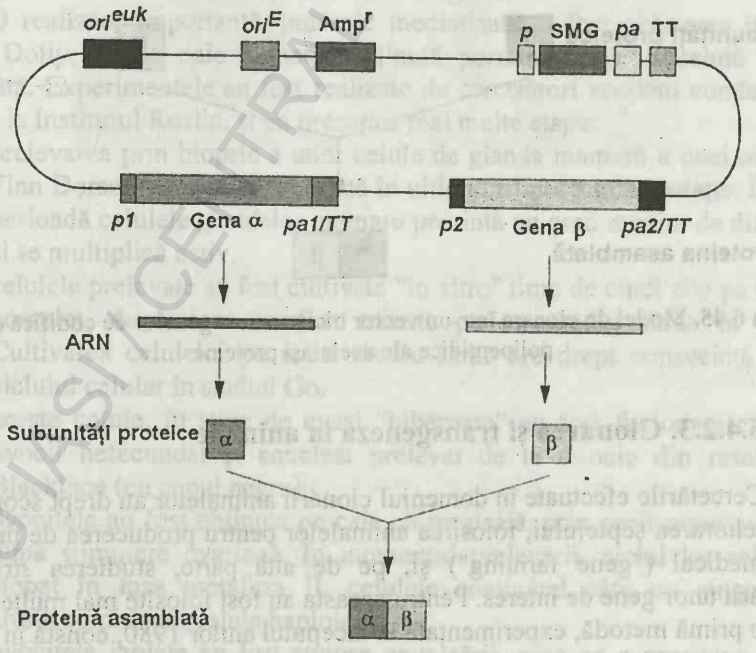


Figura 6.44. Sistem de exprimare simultană a două gene clonate în același vector, sub controlul unor elemente reglatoare distincte (promotor = p și secvență de terminare/poliadenilare) = pa/TT)

Vectorii bicistronici presupun clonarea in acelaşi vector a genelor implicate în codificarea unei proteine active multimerice, sub controlul unui singur promotor şi a unei singure secvenţe de terminare, ele fiind separate de de o secvenţă de ADN ce conţine un semnal de interacţiune cu ribosomul (IRES= „internal ribosomal entry site")(figura 6.45).

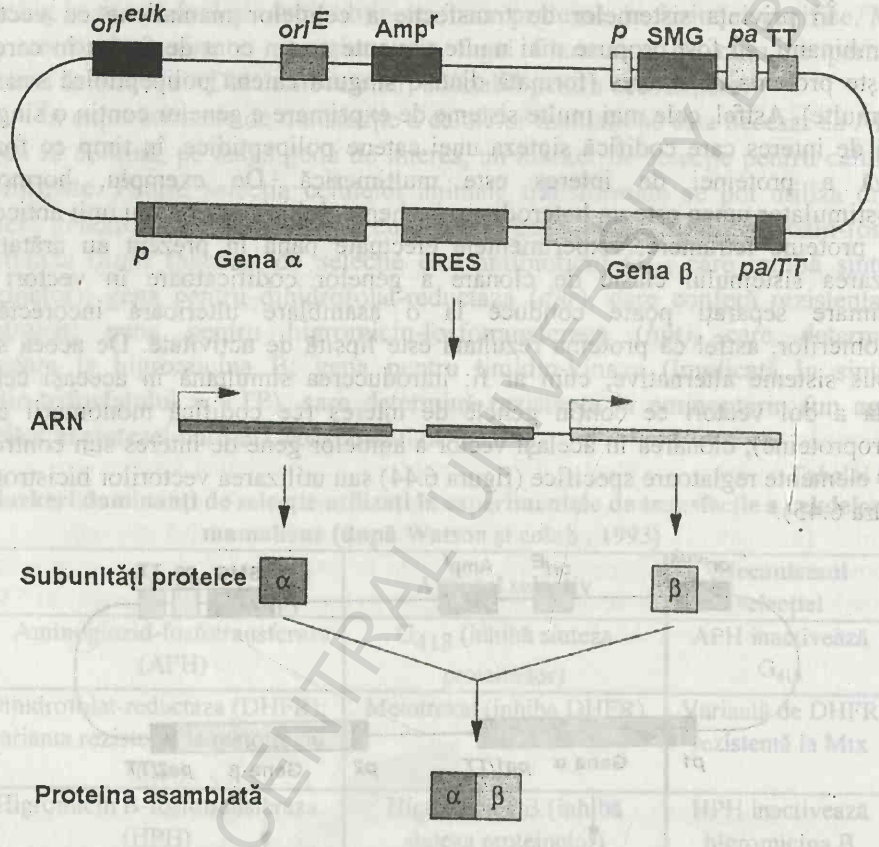


Figura 6.45. Model de clonare într-un vector bicistronic a genelor ce codifică catenele polipeptidice ale aceleiaşi proteine

6.4.2.3. Clonarea şi transgeneza la animale

Cercetările efectuate în domeniul clonării animalelor au drept scop, pe de o parte ameliorarea şeptelului, folosirea animalelor pentru producerea de proteine de interes medical ("gene farming") şi, pe de altă parte, studierea structurii şi funcţionării unor gene de interes. Pentru aceasta au fost folosite mai multe metode:

- o primă metodă, experimentată la începutul anilor 1980, constă în clonarea, spre exemplu a unor viţei, prin secţionarea în două a unui embrion aflat în stadiul de morulă sau blastocist. Fiecare jumătate de embrion a fost apoi transplantată în uterul unei vaci pregătită hormonal pentru a purta sarcina.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITATEA BRAŞOV

- o a doua metodă, mai eficientă decât prima, aplicată deja în cazul bovinelor, presupune utilizarea de ovocite (obţinute din abatoare) care sunt maturate "in vitro" până la stadiul de metafază II. După aceasta, ele sunt enucleate şi fuzionate cu celule provenite de la un embrion aflat în stadiul de morulă. Embrionii utilizaţi în asemenea experimente proveneau de la exemplare de elită, însămânţate cu sperma unui taur de elita. Pentru a se obţine celulele embrionare, se îndepărtează mai întâi membrana pellucida, iar celulele se incubează "in vitro" în absenţa calciului pentru a destabiliza joncţiunile celulare şi a obţine blastomerele. Toate blastomerele (în cel mai fericit caz în număr de 20) sunt identice, una dintre ele fiind folosită pentru identificarea sexului embrionului iniţial. Celulele obţinute în acest fel au fost apoi fuzionate cu ovocitele enucleate. Această tehnică cunoaşte însă unele limitări ce ţin de următoarele aspecte:
  - numărul iniţial de embrioni identici obţinuţi - în medie 5-6 embrioni, faţă de 20 numărul ideal;
  - dintre embrionii obţinuţi, doar 30% se dezvoltă "in vitro" până la stadiul de blastocist. Procentul scade la 7% atunci când embrionii sunt congelaţi;
  - rata scăzută a naşterii de organisme clonate, în raport cu numărul iniţial de embrioni "reconstituiţi",;
  - dintre clonele obţinute, 5% sunt exagerat de mari la naştere şi manifestă fragilitate.

O realizare importantă, puternic mediatizată, a fost obţinerea în 1996 a celebrei Dolly, prima oaie clonată, obţinută pornind de la o celulă somatică diferenţiată. Experimentele au fost realizate de cercetători scoţieni conduşi de Ian Wilmutt, la Institutul Roslin, şi au presupus mai multe etape:

- prelevarea prin biopsie a unor celule de glanda mamară a unei oi din rasa Finn Dorset (cu capul alb) aflată în ultimul trimestru de gestaţie. În această perioadă celulele glandelor mamare prezintă un grad maxim de diferenţiere şi se multiplică activ.
- celulele prelevate au fost cultivate "in vitro" timp de cinci zile pe un mediu complet, după care au fost trecute pe un mediu sărac în nutrienţi. Cultivarea celulelor pe acest mediu sărac are drept consecinţă stoparea ciclului celular în stadiul Go.
- aceste celule, în stare de cvasi "hibernare" au fost fuzionate cu câte un ovocit nefecundat şi enucleat prelevat de la o oaie din rasa Scottish Blackface (cu capul negru).
- ovocitele au fost obţinute pe cale chirurgicală, prin perfuzarea oviductelor după stimulare ovariană. În momentul prelevării, ciclul lor celular este stopat în faza metafaza II, celulele conţinând câte un singur set de cromosomi (sunt celule haploide).
- ovocitele izolate au fost supuse enucleării, ceea ce a presupus aspirarea cromosomilor aflaţi în placa metafazică, a unei părţi a citoplasmei

ovocitului precum şi a globulului polar adiacent. Celulele enucleate obţinute au fost trecute pe un mediu de cultură specific şi incubate la 37°C.

- ovocitele enucleate au fost "activate" cu ajutorul unui impuls electric, după care au fost fuzionate cu celule din glanda mamară a oii donatoare. Fuziunea celulelor a fost stimulată prin aplicarea unor pulsuri electrice.

Metodologia descrisă a permis obţinerea a nu mai puţin de 277 embrioni care au fost plasaţi în oviductele ligaturate ale unor femele. După 6 zile, 247 embrioni au fost recuperaţi. Dintre aceştia, 29 s-au dezvoltat până la stadiul de morulă sau blastocist ei fiind implantaţi apoi în uterul a 13 oi purtătoare (adoptive). Un singur embrion s-a dezvoltat normal şi a dus la naşterea unui miel clonat, „botezat" Dolly (figura 6.46).

Figura 6.46. Fotografia oiţei Dolly, alături de "mama" purtătoare (după Postel-Vinay şi Millet, 1997)

Urmând un protocol similar, un alt grup de cercetători scoţieni au reuşit să obţină trei miei pornind de la celulele unui foetus de 26 zile, precum şi patru miei pornind de la celulele unui embrion de 9 zile.

Metoda folosirii de ovocite enucleate în care s-a introdus nucleul unei celule diploide a fost elaborată mai multă vreme (1938, 1952), fiind aplicată iniţial la amfibieni, pentru demonstrarea faptului că fiecare dintre celulele unui embrion conţine întreaga informaţie genetică a unui individ. Ulterior (1983) s-a pus la punct o tehnică de transfer nuclear la şoareci, rezultatele fiind însă neconcludente. În 1984, în urma unor experimente realizate în Anglia la Universitatea Cambridge, s-a reuşit obţinerea de oi adulte pornind de la celule ale unor embrioni aflaţi în stadiul de 8-16 celule, ai căror nuclei au fost introduşi în ovocite enucleate.

Rezultate semnificative au fost obţinute şi la bovine: din 1986 când asemenea experimente au fost aplicate, s-au născut aproximativ 2000 de viţei clonaţi. Cu toate acestea, în cazul mamiferelor mari, eficienţa clonării este destul

de redusă deoarece pot apărea anomalii cromosomale ce determină stoparea dezvoltării embrionilor. Apariţia acestor anomalii s-ar datora nesincronizării dintre celulele folosite în experimentele de fuziune. Pentru depăşirea acestei probleme, s-a încercat preactivarea ovocitului prin tratamente chimice sau prin şocuri electrice astfel încât să crească nivelul calciului intracelular (aşa cum se întâmplă în mod normal în prezenţa spermatozoidului în momentul fecundării). Activarea ovocitului permite ca nucleul celulei donatoare, odată pătruns în noua celulă, să nu-şi piardă învelişul nuclear şi să funcţioneze în aceasta.

Meritul echipei scoţiene care a reuşit clonarea oii Dolly a fost acela că, pe lângă activarea electrică a ovocitului acceptor, au "prelucrat" celulele somatice donatoare, în sensul stopării ciclului celular în faza G_0. Aceasta a permis obţinerea pentru prima dată de embrioni viabili folosind în procesul de fuziune nuclei ai unor celule somatice diferenţiate. Fenomenul era considerat de majoritatea specialiştilor ca imposibil deoarece, se cunoaşte faptul că, deşi toate celulele unui organism conţin aceeaşi informaţie genetică, în cursul dezvoltării embrionare se declanşează procesul de diferenţiere celulară care conduce la specializarea celulelor. În celulele specializate, doar o mică parte din gene se exprimă, restul fiind inactive, represate prin diferite mecanisme. Depăşirea acestui impediment (specializarea celulară) s-a realizat prin crearea condiţiilor de stopare a ciclului celular al celulelor somatice în faza G_0. Acest „artificiu" de tehnică a fost descoperit întâmplător, datorită „greşelii" unui tehnician care a uitat să adauge necesarul de nutrienţi (ser) în mediul de cultură folosit pentru cultivarea celulelor specializate.

O problemă care a apărut pe parcursul experimentelor de clonare a fost aceea a „vârstei" reale a clonelor obţinute: acestea au vârsta biologică a organismului respectiv sau vârsta organismului care a donat materialul genetic? Această dilemă a rezultat din observaţiile citogeneticienilor referitoare la scăderea lungimii cromosomilor (la nivelul telomerelor) din celulele somatice pe măsură ce organismul îmbătrâneşte.

În cazul lui Dolly s-a observat că dimensiunea cromosomilor din celulele somatice nu corespunde celei observate la animalele de aceeaşi vârstă cu clona: ei sunt mai scurţi, fiind asemănători celor de la mama donatoare. De altfel, simptomele unei îmbătrâniri premature a lui Dolly a determinat eutanasierea acesteia în 2003 datorită artritei şi unor afecţiuni pulmonare, după ce aceasta a născut de mai multe ori (a dat naştere la patru miei)(figura 6.47). Fenomenul nu a fost însă detectat în cazul tuturor animalelor clonate obţinute până în prezent astfel că nu se poate emite o concluzie cu caracter general. Mai mult, cercetări recente asupra cauzelor supravieţuirii reduse a embrionilor clonaţi precum şi a supra celor care prezintă numeroase anomalii (Humphreys şi colab., 2001) au evidenţiat faptul că există diferenţe în ceea ce priveşte modul şi nivelul de exprimare al anumitor gene în celulele clonelor care se datorează gradului diferit de metilare/demetilare al acestora.

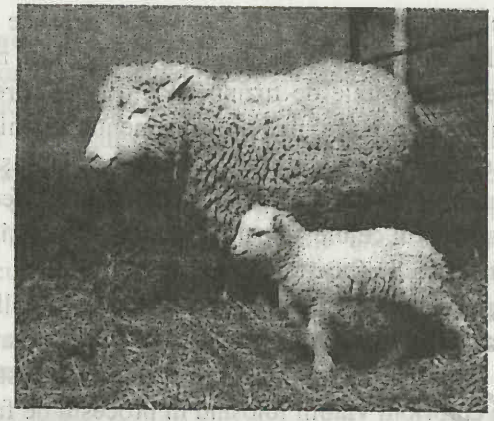


Figura 6.47. Fotografia lui Dolly, alături de primul său născut, Bonnie (după Klug şi Cummings, 2003)

Pornind de la această observaţie, se poate spune că nici clonele nu sunt organisme total identice, existând diferenţe în ceea ce priveşte modul de exprimare al anumitor gene în cursul diferenţierii celulare. De asemenea, reprogramarea genelor active şi a celor inactive în cursul procesului de clonare la bovine a condus la o serie de eşecuri notabile în domeniu: moartea clonelor la scurtă vreme după naştere (între 1 şi 9 luni).

Experimentele de clonare a mamiferelor nu s-au limitat doar la ovine sau bovine, ci ele au fost extinse şi la alte specii, unele de interes economic (caprinele - în 1999, porcinele – în 2000, măgari - 2003), altele de interes ştiinţific, în scop fundamental (şoarecii şi primatele). Optimizarea metodologiei de clonare la organismele animale permite obţinerea ulterioară a organismelor transgenice, modificate în scopul dorit de experimentator.

Surprinzător a fost faptul că, în ciuda studiilor intense la care au fost supuşi şoarecii, clonarea acestora a devenit un fapt împlinit abia în 1998 când, la Universitatea din Hawaii, dr.Teruhiko Wakayma a reuşit obţinerea a 22 femele de şoarece, clonate prin utilizarea unei metode asemănătoare celei folosite pentru Dolly, metoda fiind denumită „Honolulu". Pentru obţinerea şoarecilor clonaţi s-au utilizat nucleii unor celule diferenţiate: celule ovariene de tip „cumulus", motiv pentru care prima femelă de şoarece născută prin transferul nucleilor unor asemenea celule în ovule enucleate a fost numită Cumulina.

Reclama intensă făcută lui Dolly a determinat intensificarea cercetărilor şi asupra altor mamifere, inclusiv a primatelor, rezultatele pozitive care s-ar obţine în cazul acestora „deschizând drumul" pentru următoarea etapă – clonarea umană.

În 1997 Don Wolf de la Universitatea din Portland, Oregon a comunicat reuşita clonării la maimuţe (prin transfer de nuclei de la celule embrionare) prin obţinerea a două clone denumite Neti şi Ditto, iar în anul 2000 a fost prezentată o nouă clonă care, de astă dată provine din scindarea celulelor embrionare obţinute după fecundare „in vitro".

Cu toate aceste realizări, eficiența clonării la primate este extrem de scăzută, cercetările asupra blastociștilor dezvoltați după clonare evidențiind un adevărat „muzeu al ororilor" cum a denumit Gerald Schatten modificările profunde ale celulelor studiate. Astfel, examinarea la microscop a acestor celule a evidențiat faptul că nucleul străin introdus în ovulul enucleat prezintă anumite „desincronizări" față de celula în care se află; de asemenea, în cursul primei diviziuni mitotice cromosomii se sunt complet duplicați iar separarea lor se face anormal, iar la embrionul aflat în stadiul de opt celule unele celule conțin prea mult ADN în timp ce în altele ADN lipsește (Schatten și colab., 2000).

În ceea ce privește clonarea umană, această perspectivă a declanșat pe întreg globul dezbateri intense atât între specialiști cât și în rândurile publicului larg. Chiar dacă din punct de vedere tehnic lucrurile sunt destul de complicate, ideea obținerii clonelor umane a înspăimântat pe unii și i-a entuziasmat pe alții. Concluzia de până acum este interzicerea în majoritatea țărilor europene a experimentelor ce vizează clonarea umană, indiferent de scopul cercetărilor. Doar în Marea Britanie, guvernul condus de Tony Blair a impus o lege prin care se permit experimentele de clonare umană, în scop terapeutic („clonarea terapeutică"), pentru corectarea unor deficiențe ereditare, pentru grefe sau înlocuirea unor organe sau pentru tratarea unor maladii incurabile. Deși criticată, legea britanică permite desfășurarea unor experimente de tipul celor de vizează obținerea de embrioni umani clonați care să constituie surse de celule sușă totipotente utile pentru tratarea unor boli incurabile, cum ar fi maladiile Parkinson, Alzheimer, diabet sau a bolilor de inimă (Gireau, 2001). Trebuie menționată însă realizarea unor cercetători americani, de la firma Advanced Cell Technology, care, la sfârșitul anului 2001 au comunicat, obținerea în laborator a primelor trei clone umane, mai exact a primilor embrioni clonați formați din șase celule (figura 6.48).

Deși experimentul s-a încheiat cu un eșec, embrionii clonați supraviețuind doar 48 de ore, dezbaterile asupra acceptării sau nu a acestui tip de cercetări continuă cu aceeași intensitate. Cu toate eșecurile diverselor laboratoare americane și a interzicerii experimentelor de acest tip în Europa, în Coreea cercetările au avansat puternic și au permis ca în 2004 să fie obținuți 30 embrioni umani (până la stadiul de blastocist) din care au fost obținute apoi numeroase linii celulare utile în studiile asupra celulelor stem și a utilizării acestora (Hwang și colab., 2004).

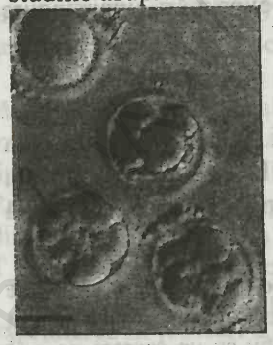


Figura 6.48. Aspectul microscopic al celor trei clone umane obținute de firma Advanced Cell Technology

Printre cele mai recente realizări în domeniul clonării este de menţionat pisicuţa CC („carbon copy cat clone") născută la sfârşitul anului 2001 la Texas A&M University. Metodologia de clonare utilizată de dr.Mark Westhusin este similară celei aplicate pentru clonarea la şoareci: s-au utilizat nuclei de la celule de tip cumulus de la o pisică calico care au fost transferaţi în ovule enucleate provenite de la o altă pisică. Din cei 87 embrioni rezultaţi prin metoda respectivă, a supravieţuit doar unul singur, eficienţa procesului fiind scăzută, asemănătoare celei înregistrate în cazul clonării la ovine şi bovine. Pisicuţa rezultată prin acest procedeu a evidenţiat un colorit al blănii diferit de cel al mamei genetice, explicaţia fiind aceea a intervenţiei şi altor factor reglatori ai dezvoltării, suplimentari celor genetici (factori epigenetici). Trebuie menţionat faptul că această realizare a fost posibilă datorită proiectului Missyplicity, declanşat în 1998 prin investirea de către un milionar anonim a sumei de 2,3 milioane de dolari (ulterior suma a crescut la 3,7 milioane în anul 2001) pentru clonarea unui câine de 12 ani, numit Missy. Incercările de până acum pentru clonarea lui Missy au eşuat dar reuşita înregistrată în cazul pisicii CC deschide perspective noi, încurajatoare. Cu toate acestea, în 2005, tot în Coreea s-a reuşit clonarea primului câine, a lui Snuppy, un ogar afgan născut de o mamă „surogat" din rasa labrador retriever.

6.4.2.4. Şoareci transgenici

Aşa cum s-a prezentat în capitolul anterior, au fost elaborate numeroase metode de introducere a genelor în celulele mamaliene, rămânând problema urmăririi exprimării şi funcţionării lor la nivelul întregului organism. Drept model experimental de mamifer au fost preferaţi şoarecii, cu care s-au realizat numeroase experimente. La aceste mamifere s-a reuşit manipularea unor gene implicate în dezvoltarea embrionară şi, de asemenea, introducerea unor gene (**transgene**) în embrioni. După ce genele dorite au fost introduse în genomul celulelor embrionare, s-au obţinut embrioni (în diferite stadii de dezvoltare) precum şi organisme adulte care au putut fi analizate în vederea exprimării şi efectului fenotipic al genelor clonate (figura 6.49). Experimentele de acest tip au permis nu numai identificarea elementelor genetice care determină exprimarea ţesut-specifică a unor gene (a unora dintre genele mamaliene), ci şi efectele fenotipice ale exprimării unei singure gene sau mai multor gene asociate.

Şoarecii transgenici pot reprezenta un model de studiu al unor boli genetice umane, inclusiv a genelor implicate în dezvoltarea anormală şi în apariţia cancerului.

Figura 6.49. Aspectul unui „super-şoarece" transgenic, ce conţine clonată o genă de la şobolan, ce codifică sinteza hormonului de creştere, comparativ cu un şoarece normal (după Bourgaize şi colab., 2000).

După introducerea unei gene străine într-o populaţie celulară ţintă pot apărea cel puţin trei posibilităţi de evoluţie a genei de interes pentru fiecare celulă:

- gena străină nu se integrează în genomul gazdei;
- gena de interes se integrează la întâmplare în genom;
- gena heterologă se inseră prin recombinare pe bază de omologie la nivelul unui anumit cromosom, înlocuind gena endogenă.

Deşi o genă străină se integrează la un situs cromosomal diferit de cel de origine, exprimarea sa se realizează, deseori, într-un mod similar celui al genei endogene, dacă se îndeplinesc anumite condiţii. Pentru a determină modul de exprimare a genei clonate se analizează mai multe tipuri de ţesuturi în privinţa prezenţei ARN sau a proteinelor codificate de gena clonată (transgena), comparându-se în acelaşi timp cu produsele similare endogene. Spre exemplu, ARNm ce copiază gena pentru insulina umană clonată în şoareci poate fi uşor diferenţiat de ARNm pentru insulina de şoarece. Asemenea experimente pot oferi informaţii asupra exprimării ţesut-specifice a unor gene precum şi asupra semnalelor de transcriere a genelor (Watson şi colab., 1992).

Rezultate interesante au fost obţinute prin clonarea genei pentru insulina umană în şoareci. Insulina este un hormon polipeptidic implicat în reglarea metabolismului glucidic. Aceasta proteină este sintetizată în mod normal doar de celulele β din pancreas (din insulele Langerhans). Prin examinarea şoarecilor transgenici ce conţin aceasta genă s-a evidenţiat faptul că ARNm pentru insulina umană există doar în celulele pancreatice, nu şi în alte ţesuturi. Aceasta înseamnă că transcrierea genei clonate a fost indusă de aceleaşi semnale ca şi gena endogenă. În acest fel, nu numai că transgena s-a exprimat în ţesutul normal (corect), ci ea a fost supusă aceloraşi semnale reglatoare ca şi genele endogene.

De asemenea, dacă sunt cunoscute secvenţele responsabile de reglarea ţesut-specifică a unei gene, acestea ar putea fi folosite pentru a determină exprimarea unei anumite proteine într-un ţesut în care de obicei ea nu este produsă. Pornind de la aceasta idee şi cunoscându-se regiunea din gena pentru insulină care determină exprimarea sa doar în celulele β, pentru a urmări exprimarea genei pentru antigenul T (oncogena) de la SV40 clonarea s-a realizat sub controlul secvenţelor promotor-enhancer ale genei pentru insulină. Molecula recombinată de ADN folosită în asemenea experimente este alcătuită dintr-o secvenţă de 660 pb provenită din regiunea 5' a genei pentru insulina de şobolan, linkată la regiunea din genomul viral de SV40 ce codifică antigenul T.

S-a remarcat că şoarecii transgenici ce conţin această genă mor după 9-12 săptămâni de viaţă. Analiza histopatologică a acestor şoareci a evidenţiat faptul că toţi prezentau o hiperplazie cu aspect tumoral a celulelor insulelor Langerhans, în timp ce restul ţesuturilor erau normale, deşi conţineau integrată transgena. Rezultatele obţinute au permis concluzia ca regiunea promotor-enhancer provenită din gena pentru insulina de şobolan a determinat exprimarea genei pentru antigenul T doar în celulele pancreatice.

Într-un alt tip de experimente cu şoareci transgenici a fost examinată exprimarea în ţesuturi specializate a unor transgene care, clonate sub controlul unor elemente reglatoare ale gazdei, determină degenerarea sau chiar moartea celulelor transformate. Spre exemplu, prin clonarea genei pentru catena A din toxina difterică sub controlul regiunii promotor a genei pentru elastază (ce se exprimă

doar în celulele pancreasului exocrin), s-au obținut 24 șoareci ce conțin gena clonată. Dintre aceştia, şapte nu aveau pancreas normal, prin examinarea histologică demonstrându-se că animalele prezentau un pancreas rudimentar, fenomen numit ablație celulară.

O variantă a acestui tip de experiment a constat în utilizarea pentru clonare a genei pentru timidin-kinază (*tk*) de la virusul herpes 1, integrată sub controlul unui promotor specific pentru o genă ce funcționează doar în țesutul țintă. Celulele transformate, ce conțin o asemenea secvență de ADN, sunt distruse doar dacă șoarecelui gazdă i se inoculează nucleozide sintetice de tipul ganciclovirului. Nucleozidele în sine nu sunt toxice, dar gena virală pentru timidin-kinază, prin produsul său, le metabolizează în compuşi care omoară celulele în diviziune (se formează ganciclovir trifosfat care este un inhibitor al ADN-polimerazei şi deci a sintezei de ADN) (Etienne şi colab., 2001).

Această tehnică a fost folosită pentru a determină modul de formare (diferențiere) a liniilor celulare funcționale din hipofiza anterioară. Astfel, se credea că celulele producătoare de prolactină provin dintr-o linie celulară comună cu celulele ce sintetizează hormonul de creştere (HC). Cele două tipuri de celule au fost utilizate drept țintă pentru exprimarea genei *tk*, clonată fie sub controlul promotorului genei pentru hormonul de creştere (HC) de la şobolan, fie sub cel al genei pentru prolactină. După injectarea nucleozidelor sintetice s-a observat că animalele cu transgena *tk* şi promotorul HC au rămas pitice şi erau lipsite atât de celulele producătoare de hormon de creştere, cât şi de cele producătoare de prolactină. În cazul animalelor ce conțineau transgena *tk* şi promotorul genei pentru prolactină, acestea au fost normale. Concluziile desprinse din acest experiment au fost:

- celulele producătoare de prolactină nu se mai divid şi, deci, nu pot fi omorâte de produşii de degradare ai nucleozidelor;
- celulele ce determină sinteza hormonului de creştere pot fi considerate ca precursori ai ambelor tipuri de celule, deoarece şoarecii transgenici ce conțineau primul tip de construct prezentau distrugeri la nivelul ambelor tipuri de celule, nu numai a celor considerate, teoretic, drept țintă a timidin-kinazei virale.

O atenție specială s-a acordat recombinării pe bază de omologie care poate fi utilizată pentru inactivarea unei gene țintă în urma integrării transgenei. Procedeul, cunoscut sub numele de „knock-out" a permis realizarea în 1992 a unui model murin al mucoviscidozei (fibrozei chistice), prin inactivarea genei CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" – genă care codifică o proteină implicată în transportul transmembranar al ionilor de clor) de la şoarece (Etienne şi colab., 2001).

Pentru a inactiva o genă prin recombinare pe bază de omologie se procedează în felul următor:

- se utilizează un **vector specific** (de exemplu, o plasmidă) în care s-a introdus o secvență identică cu o porțiune a genei ce se dorește a fi inactivată, după care, în mijlocul unui exon, se inseră o secvență străină (cum ar fi secvența *neo*, pentru rezistența la G418), scopul fiind inactivarea genei de interes)
- molecula recombinată rezultată este introdusă în celule embrionare de şoarece care conțin gena omologă, normală, aceasta fiind **gena țintă**

- în celulele embrionare transformate, moleculele recombinate au trei posibilități:
  - integrarea corectă: vectorul formează un complex cu proteinele celulare implicate în recombinarea omologă care determină recunoașterea secvențelor omoloage și asigură înlocuirea genei țintă de secvența inactivată. Eficiența procesului de recombinare de acest tip este destul de mică: doar 0,1% dintre celulele din cultură conțin secvența de interes integrată corect
  - inserarea la întâmplare în genomul celulei țintă
  - absența integrării (figura 6.50).
- selecția celulelor modificate se face pe baza rezistenței/sensibilității la antibioticul G418 și/sau ganciclovir.

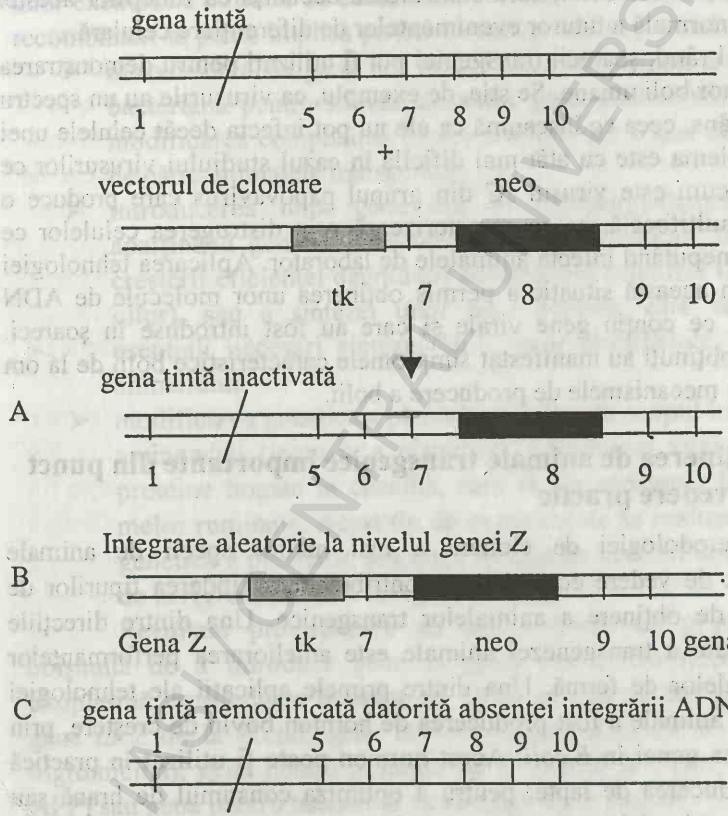


Figura 6.50. Reprezentarea schematică a inactivării unor gene țintă prin tehnica „knock-out" (după Etienne și colab., 2001)

Șoarecii transgenici au permis studierea, prin recombinare omologă, a sistemelor complexe de gene, cum sunt cele ce controlează sistemul major de histocompatibilitate, sau cele ce controlează dezvoltarea organismului. De asemenea, prin folosirea unor gene marker sau de referință ("reporter genes") s-a

reuşit identificarea anumitor gene ale gazdei. Genele marker se pot exprimă doar sub controlul unor gene endogene active, astfel că funcţiile unor anumite regiuni cromosomale implicate în dezvoltare pot fi studiate doar în ţesuturi specifice sau într-un anumit moment al dezvoltării ontogenetice.

Mai mult, şoarecii transgenici au fost utilizaţi şi pentru analizarea evenimentelor ce ţin de determinismul sexelor, evidenţiindu-se faptul că există o singură genă, notată *Sry*, localizată pe cromosomul Y care, dacă este clonată într-un şoarece XX, poate determină evoluţia spre sexul mascul. Examinarea şoarecilor transgenici a evidenţiat faptul că, deşi genetic sexul lor era de tip femel, în fapt ei prezentau toate caracteristicile unui şoarece mascul, cu excepţia faptului că acesta era steril. Aceste rezultate arată că gena *Sry* este cea care determină dezvoltarea ţesuturilor şi apoi a organelor sexuale de tip mascul dar că există şi alte gene, localizate pe alţi cromosomi, care controlează declanşarea funcţiilor acestei gene şi desfăşurarea normală a tuturor evenimentelor de diferenţiere celulară.

Nu în ultimul rând, şoarecii transgenici pot fi utilizaţi pentru demonstrarea naturii şi evoluţiei unor boli umane. Se ştie, de exemplu, ca virusurile au un spectru de gazdă foarte restrâns, ceea ce înseamnă ca ele nu pot infecta decât celulele unei anumite specii. Problema este cu atât mai dificilă în cazul studiului virusurilor ce produc boli la om (cum este virusul JC din grupul papovavirus care produce o leucoencefalopatie multifocală, ce se caracterizează prin distrugerea celulelor ce produc mielină), ele neputând infecta animalele de laborator. Aplicarea tehnologiei ADN recombinant în această situaţie a permis obţinerea unor molecule de ADN prelucrate "in vitro" ce conţin gene virale şi care au fost introduse în şoareci. Şoarecii transgenici obţinuţi au manifestat simptomele caracteristice bolii de la om astfel că se pot studia mecanismele de producere a bolii.

6.4.2.5. Obţinerea de animale transgenice importante din punct de vedere practic

Stabilirea metodologiei de clonare a mai multor specii de animale importante din punct de vedere economic a contribuit la extinderea tipurilor de experimente la cele de obţinere a animalelor transgenice. Una dintre direcţiile majore de aplicabilitate a transgenezei animale este ameliorarea performanţelor productive ale animalelor de fermă. Una dintre primele aplicaţii ale tehnologiei ADN recombinant la animale a fost producerea de hormon bovin de creştere, prin clonarea şi exprimarea genei în *E.coli*. Acest hormon poate fi utilizat în practică pentru a stimula producerea de lapte, pentru a optimiza consumul de hrană sau creşterea în greutate, animalele tratate în acest fel putând fi utilizate fără risc în alimentaţia umană. De asemenea, rezultate semnificative au fost obţinute prin clonarea genei pentru hormonul uman de creştere (hGH = "human growth hormone") în diferite specii de animale de fermă: porci, oi, iepuri. Cu toate ca rezultatele obţinute au fost, în multe situaţii, spectaculoase, până în prezent ele nu au fost aplicate la nivel industrial existând încă multe reticenţe în ceea ce priveşte extinderea unor asemenea experimente.

Animalele transgenice (de exemplu, porci) ce conțin gena ce codifică sinteza hGH sunt mai eficiente în utilizarea hranei și cresc mai repede. Aceste animale prezintă însă și anumite probleme fiziologice ce se datorează faptului că gena pentru hGH se exprimă continuu, de-a lungul vieții organismului modificat genetic, în timp ce la animalele normale hormonul de creștere este sintetizat doar în a doua lună de dezvoltare. Pentru a se depăși această problemă, în prezent se testează posibilitatea clonării genei pentru hGH sub controlul unui promotor inductibil, a cărui funcționare să fie declanșată sau blocată de factori specifici. Spre exemplu, se poate utiliza promotorul genei pentru o metaloproteină, a cărui funcționare este controlată prin adăugarea sau eliminarea zincului (inductorul promotorului) din hrana animalului.

Rezultate interesante au fost obținute și la oi, scopul fiind acela al obținerii unor exemplare cu lână de calitate superioară. În acest domeniu, tehnologia ADN recombinant se poate implica pe trei direcții (Watson și colab., 1992):

- introducerea de gene noi în genomul oilor (cum ar fi, de exemplu, gena bacteriană pentru sinteza cisteinei, gena pentru hGH) care pot determină modificarea compoziției proteice a linii sau o mai eficientă producere a sa de către animalele transgenice;
- introducerea unor gene noi în microorganismele ruminale (bacterii aparținând genurilor *Bacteroides, Ruminococcus, Butyrivibrio*) în scopul creșterii eficienței degradarii substratului celulozic (să-l facă mai accesibil oilor), sau a sintezei unor mici peptide, care să conțină aminoacizii esențiali necesari sintezei lânii, ușor absorbabile la nivelul intestinului animalului.
- modificarea genetică a plantelor furajere în scopul îmbunătățirii balanței de aminoacizi (inclusiv a cisteinei), a biomasei vegetale și a sintezei unor proteine bogate în cisteină, care să fie rezistente la atacul microorganismelor ruminale. Acest tip de experimente se realizează prin transformarea genetică a plantelor, fenomen mediat de vectorii derivați de la plasmida Ti de la *Agrobacterium tumefaciens*.

Rezultate promițătoare au fost obținute cu pești transgenici. Metoda obișnuită de a introduce gene în pești este microinjectarea ADN exogen în citoplasmă, reușindu-se în acest fel clonarea mai multor gene: gena pentru hGH, gena *lacZ* de la *E.coli*, gene bacteriene de rezistență la antibiotice (neomicina, higromicina), gena pentru proteina de rezistență la îngheț ("antifreeze protein" = AFP) sau gena pentru hormonul de creștere de la păstrăv.

Cele mai multe rezultate la pești au fost obținute cu gena pentru hGH și cu cea pentru hormonul de creștere de la păstrăv (ADNc clonat într-un vector plasmidial ce conține secvențele terminale repetate din virusul sarcomului Rous avian, necesare exprimării eficiente), reușindu-se nu numai stimularea creșterii peștilor transgenici din prima generație, ci și a celor din generațiile următoare (transmiterea caracterului dobândit la descendenți).

Imediat după anunțarea obținerii lui Dolly, cercetătorii scoțieni au comunicat nașterea lui Polly și a altor cinci miei purtători au genei umane pentru factorul IX. Protocolul de obținere a mieilor transgenici a fost următorul: gena de interes a fost introdusă în celule fetale aflate în cultură „in vitro", iar după selecția celulelor transformate (care au incorporat în propriul genom gena de interes) ele au fost fuzionate cu ovule enucleate. Deși Polly exprima eficient gena străină clonată, succesul nu a fost deplin deoarece integrarea genei s-a făcut la întâmplare. Ulterior, optimizarea metodei de clonare, prin utilizarea clonării la situs specific ce asigură integrarea genei de interes în genomul celulei țintă prin recombinare pe bază de omologie a permis obținerea în 1999 a altor două oi transgenice, Cupidon și Diana dintre care una conținea doar o genă marker (folosind drept martor), iar cealaltă avea în plus gena pentru α-1 antitripsină, proteină umană de interes terapeutic (pentru tratamentul fibrozei chistice).

De asemenea, în anul 1999 firma canadiană Nexia Biotechnologies Inc. a anunțat nașterea a doi iezi transgenici, Webster și Peter, purtători ai genei ce determină sinteza proteinei din pânza de păianjen, pentru ca în anul următor aceștia să fie încrucișați cu femele normale. Scopul acestor experimente este ca în urma fecundării să se obțină femele în al căror lapte să se acumuleze proteina de păianjen, proteină utilă pentru obținerea de fibre rezistente folosite pentru suturi, țesături, în industria de automobile sau cea aerospațială.

Anul 2000 a adus o serie de noi rezultate: obținerea iepurelui Babe la care a fost clonată o genă izolată de la pești care codifică o proteină asemănătoare calcitoninei (utilă în tratamentul osteoporozei), proteina heterologă fiind eliminată în lapte; obținerea unor vaci transgenice care produc eritropoietină umană etc.

O atenție specială este acordată în ultimii ani obținerii porcilor transgenici. Principalul argument pentru asemenea cercetări este acela că porcul este animalul care se pretează cel mai bine pentru xenografe: dimensiunea organelor interne (în special inimă și pancreas) care corespunde celor umane permite utilizarea acestora în transplanturi la om. Limitarea majoră a xenografelor ține de respingerea acestora; de aceea, una dintre direcțiile de cercetare în domeniul transgenezei la porc este introducerea în aceste animale a genei de origine umană ce codifică un inactivator al complementului.

De asemenea, PPL Therapeutics, societatea scoțiană care a contribuit financiar la realizarea lui Dolly, iar apoi o societate americană asociată cu Universitatea Columbia au comunicat obținerea de porci transgenici (în total nouă purcelușI născuți în decembrie 2001)(figura 6.51) la care una dintre genele pentru enzima α 1,3-galactozil transferaza implicată în adăugarea unui rest glucidic la suprafața celulelor endoteliale porcine a fost inactivată. Prezența respectivului rest glucidic asigură caracterul antigenic al organelor porcine determinând în cazul xenografelor la om un răspuns imun puternic, însoțit de respingerea grefelor (xenografelor). Inactivarea uneia dintre genele codificatoare pentru enzima menționată conduce la absența restului glucidic de la nivelul celulelor porcine, astfel că anticorpii umani sau cei de primate nu mai recunosc celulele respective ca

străine, iar sistemul complement nu se mai activează. Asemenea animale transgenice ar putea fi folosite drept donatori de organe pentru transplanturi (Hinfray, 2002; Kelly, 2003). Mai mult, grefarea în 2001 a unor celule embrionare de porc la nivelul creierului a 12 persoane atinse de maladia Parkinson a permis ameliorarea stării clinice a bolnavilor, deschizând în acest fel noi perspective terapeutice.

Figura 6.51. Purcei clonați obținuți în Scoția de firma PPL Therapeutics

Primul animal transgenic obținut până în prezent și destinat alimentației umane este somonul. Astfel, cercetările au început prin examinarea posibilității clonării la pești a unei gene ce codifică o proteină ce asigură rezistența la îngheț a organismelor transgenice respective. Proteina AFP („antifreezing protein"), izolată de la peștii din zona arctică, este compusă din unități de Ala-Ala-Thr repetate, legate de un glucid (galactozil-n-acetil galactozamina), la nivelul treoninei. Gena ce codifică o asemenea proteină a fost izolată și clonată în specii de pești care, în mod normal, prezentau sensibilitate la temperaturi scăzute ale apei. Scopul clonării era de a reuși aclimatizarea somonilor în apele reci din nordul Canadei. Gena clonată s-a exprimat însă destul de slab iar animalele transgenice obținute nu au manifestat o rezistență crescută la temperaturi scăzute comparativ cu animalele de tip sălbatic. În schimb s-a observat însă că promotorul genei AFP introdus în genomul unei specii de somon din Pacific a determinat stimularea funcționării genei pentru hormonul de creștere. Astfel, în loc să se activeze și să funcționeze doar primăvara în hipofiză, gena pentru hormonul de creștere de la somonii transgenici este activă tot timpul anului, ea exprimându-se și în alte organe decât hipofiza (de exemplu, în ficat). Prin comparație, somonii transgenici obținuți în acest fel cresc de șase ori mai repede decât cei normali, ceea ce ar asigura firmelor producătoare profituri importante.

Acvacultura permite, cel puțin teoretic, obținerea unor producții crescute, dar practic apar o serie de limitări ce țin, între altele, de apariția unor boli

devastatoare, de implicaţiile ecologice ale răspândirii peştilor transgenici şi, nu în ultimul rând, de reacţiile de respingere a unei părţi a populaţiei faţă de alimentele modificate genetic.

În concluzie, sistemele de exprimare a genelor în celulele mamaliene sunt la fel de eficiente ca şi în cazul altor tipuri de gazde eucariote. Cu toate acestea producerea la nivel industrial a proteinelor recombinate cu ajutorul celulelor mamaliene prelucrate „in vitro" este extrem de costisitoare şi, de cele mai multe ori, controversată. De aceea, cele mai numeroase aplicaţii biotehnologice la nivel industrial sunt cele ce utilizează microorganismele, inclusiv cele modificate genetic.

6.5. APLICAŢII PRACTICE ALE MICROORGANISMELOR RECOMBINATE

Aşa cum s-a menţionat anterior, cu toate avantajele pe care organismele superioare le prezintă în cazul clonării unor gene de interes, cele mai multe aplicaţii inclusiv la nivel industrial au fost obţinute prin utilizarea drept gazde a unor specii variate de bacterii sau drojdii, mai rar fungi filamentoşi. Cele mai cunoscute rezultate se referă la prelucrarea genetică a unor celule gazdă în vederea producerii în cantităţi mari a unor enzime, a unor compuşi cu masă moleculară mică cum ar fi unele antibiotice, aminoacizi, coloranţi, vitamine, precursori ai unor biopolimeri sau pentru a putea degrada diverse substanţe macromoleculare.

Un prim exemplu este cel al obţinerii şi comercializării de **enzime de restricţie**. Până în prezent există peste 300 de enzime comercializate de diferite firme de specialitate, veniturile acestora doar din vânzările acestor tipuri de enzime fiind de ordinul sutelor de milioane de dolari. Este cunoscut faptul că enzimele de restricţie sunt sintetizate de o gamă foarte variată de bacterii dar în cazul manipulărilor genetice în scopuri industriale acesta este un impediment în obţinerea unei eficienţe convenabile. De aceea, majoritatea rezultatelor obţinute se bazează pe *E.coli*, prin introducerea genelor ce codifică atât sinteza endonucleazelor de restricţie cât şi a enzimelor de modificare corespunzătoare, gene izolate din diferite specii bacteriene, în vectori de exprimare specifici şi asigurarea aoi condiţiilor optime de exprimare. Cea mai cunoscută strategie de clonare este cea a obţinerii genei de interes prin clivarea ADN cromosomal cu o anumită enzimă de restricţie şi apoi introducerea acesteia într-un vector de clonare linearizat cu aceeaşi enzimă, după care moleculele de ADN recombinant sunt folosite pentru transformarea unor celule de *E.coli*. Selecţia clonelor ce au primit ADN de interes se realizează prin infecţia acestora cu bacteriofagul λ: clonele rezistente sunt considerate a fi cele care au primit genele de interes ele fiind apoi multiplicate şi utilizate în practică (Brooks şi colab., 1991).

O altă aplicație semnificativă este producerea de **compuși biologic activi cu moleculă mică.** Astfel, utilizând tehnologia ADN recombinant se pot modifica diverse căi metabolice fie prin introducerea unor noi gene în operonii inițiali fie prin alterarea celor existente. Scopul este obținerea unor microorganisme recombinate cu noi activități enzimatice care să permită prelucrarea unui substrat care să conducă la biosinteza unor compuși comerciali ce se obțin în mod „tradițional" prin combinarea unor căi chimice cu etape de fermentație.

Acidul L-ascorbic (vitamina C) este obținută de obicei printr-un proces complex și costisitor de sinteză ce pornește de la D-glucoză și presupune o etapă de fermentație microbiană urmată de mai multe etape de sinteză chimică. Ultima etapă este conversia acidului 2-ceto-L-gluconic (2-KLG) la acid ascorbic. Sunt cunoscute mai multe tipuri de microorganisme care pot fi implicate în acest proces: astfel tulpini de *Acetobacter, Gluconobacter* sau *Erwinia* pot converti glucoza la acid 2,5–diceto–L-gluconic (2,5-DKG) iar tulpini de *Corynebacterium, Brevibacterium* sau *Arthrobacter* transformă 2,5-DKG la 2-KLG. In practică pot fi utilizate culturi mixte de microorganisme cum ar fi *Erwinia herbicola* și *Corynebacterium sp.* dar acest lucru este problematic datorită particularităților specifice ale celor două tipuri de bacterii. Soluția este aceea a obținerii unei bacterii recombinate capabile să realizeze singură toate etapele procesului de conversie a glucozei la acid ascorbic. Cercetările efectuate asupra microorganismelor implicate în acest proces au evidențiat faptul că gena pentru 2,5-DKG reductaza de la *Corynebacterium sp.* a putut fi clonată și exprimată în *E.coli* iar după subclonarea sa într-un vector cu spectru larg de acțiune a fost introdusă într-o tulpină de *E.herbicola* (Anderson și colab., 1985). Celulele de *Erwinia* transformate genetic au devenit în acest fel capabile de a converti glucoza direct la 2-KLG: mai întâi enzimele membranare asigură conversia glucozei la 2,5-DKG după care enzima clonată, localizată în citoplasmă, determină conversia 2,5-DKG la 2-KLG. Mai mult, prin prelucrarea in vitro a genei pentru 2,5-DKG reducataza pentru înlocuirea anumitor aminoacizi s-au putut obține enzime cu o activitate catalitică îmbunătățită și cu o stabilitate termică ridicată, astfel că valoarea comercială a produsului poate crește.

Aminoacizii sunt compuși esențiali pentru existența celulară iar în practică pot fi utilizați în diferite domenii: în industria alimentară ca potențatori de aromă, antioxidanți, suplimente nutriționale etc; în agricultură sunt folosiți ca aditivi în furaje (feed additive); în medicină se folosesc în soluțiile aplicate pentru perfuzii postoperatorii; în industria chimică servesc drept elemente de start pentru obținerea unor polimeri sau cosmetice. Se estimează că anual se produc la nivel industrial mai mult de 800.000 t de aminoacizi, ceea ce înseamnă venituri de peste 5 miliarde de dolari la nivel mondial. Cele mai utilizate microorganisme producătoare de aminoacizi sunt tulpini aparținând genurilor *Corynebacterium* și *Brevibacterium.* Bacteriile respective sunt Gram-pozitive care nu formează spori și care se găsesc în mod natural în sol. Metoda „clasică" de ameliorare a potențialului productiv al acestor bacterii este mutageneza dar ea este greoaie și deseori ineficientă.

Alternativa găsită a fost modificarea genetică prin aplicarea tehnologiei ADN recombinant. Cele mai multe cercetări au fost efectuate cu specia *Corynebacterium glutamicum* pentru care au fost elaborați vectori de exprimare eficient și a fost optimizată o metodă eficientă de transformare. Pentru obținerea unor tulpini de *C.glutamicum* superproducătoare de triptofan s-a utilizat gena pentru acid antranilic sintetaza izolată de la o tulpină de *Brevibacterium flavum* care a fost clonată într-un vector de tip navetă pentru *E.coli* și *C.glutamicum* și utilizată pentru transformarea unei tulpini de tip sălbatic de *C.glutamicum*; transformații rezultați au produs cu 130% mai mult triptofan comparativ cu martorul netransformast. Rezultate și mai impresionante au fost obținute atunci când pentru clonare au fost folosite gene mutante (rezistente la retroinhibiția prin produs final) ce codifică alte trei enzime cheie ale căii de biosinteză a triptofanului: 3-deoxi-D-arabino-heptulosonat 7-fosfat sintetaza, antralinat sintetaza și antralinat fosforiboziltransferaza (Ikeda și colab., 1994).

Obținerea L-cisteinei, unul dintre cei mai importanți aminoacizi pentru industriile farmaceutică, alimentară și a cosmeticelor, se realizează prin extracție din hidrolizate acide de păr sau blană animală. Deși există numeroase microorganisme capabile de a sintetiza acest aminoacid ele nu pot fi utilizate la scară industrială deoarece procesul de biosinteză este supus inhibiției prin produs final (prima enzimă a căii metabolice – serin acetiltransferaza este inhibată de L-cisteină). Prelucrarea genei *cysE* astfel încât proteina codificată să devină insensibilă a inhibiția cu cisteină și clonarea ei într-o tulpină mutantă de *E.coli* a permis obținerea unor transformați capabili de a sintetiza cantități crescute de cisteină. Cu toate progresele înregistrate nu au fost obținute încă cele mai bune rezultate care să poată fi aplicate la scară industrială (Kramer, 1996).

Antibioticele reprezintă un grup heterogen de compuși biologic activi, sintetizați de o serie de microorganisme, între care bacteriile din genul *Streptomyces* ocupă un loc foarte important. La nivel mondial, anual se produc peste 100.000 tone de antibiotice care sunt utilizate fie în terapie fie ca stimulatori de creștere pentru animale. Microorganisme reprezintă o sursă majoră de noi compuși antibiotici estimându-se că în fiecare an sunt descoperite 200-300 noi asemenea compuși. Ameliorarea tulpinilor producătoare ale celor mai utilizate antibiotice se realiza până nu demult exclusiv prin mutageneză. Progresele înregistrate în ultimii 20 de ani în cunoașterea particularitățile fiziologice și genetice ale microorganismelor producătoare de antibiotice, în special a streptomicetelor, a permis desfășurarea unor experimente care au vizat modificarea genetică a acestora prin aplicarea metodelor moleculare moderne. Astfel au fost obținuți o serie de vectori dintre care unii derivați de la plasmide naturale de tipul pIJ101 (integrativi, cu replicare termosensibilă, vectori de tip navetă *Streptomyces-E.coli*, fagimide, cosmide etc) precum și unii hibrizi, așa cum sunt vectorii de tip BAC („bacterial antificial chromosomes" = cromosomi bacterieni artificiali). Vectorii BAC permit clonarea la nivelul lor a unor fragmente mari de ADN de

interes (40-100 kb) şi asigură integrarea acestora direct în cromosomul gazdei (figura 6.52).

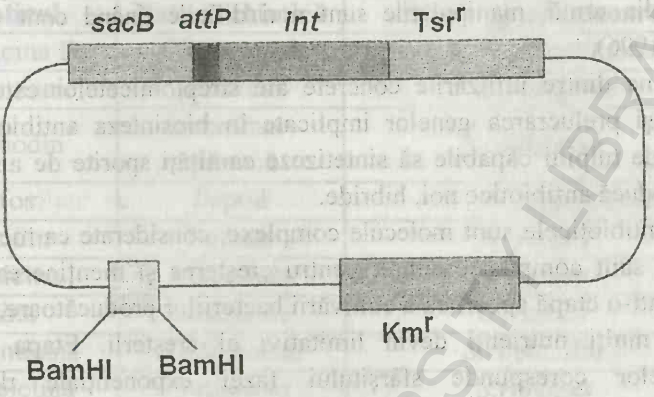


Figura 6.52. Reprezentarea schematică a unui vector de tip BAC pentru bacteriile din genul *Strepotmyces*. Vectorul conține o genă de rezistență la kanamicină (Km^r) ce se exprimă în *E.coli*, o genă de rezistență la tiostrepton (Tsr^r) ce permite selecția celulelor de streptomicete transformate, genele *attP* şi *int* ce facilitează integrarea ADN clonat în cromosomul gazdei, gena *sacB* ce codifică sinteza unei enzime ce converteşte sucroza la un compus toxic pentru celulă şi două situsuri BamHI la nivelul cărora se poate realiza clonarea fragmentului de interes (după Glick şi Pasternak., 2003)

Deşi, în general, au fost elaborate numeroase metode de transformare genetică a bacteriilor, la streptomicete metoda utilizată este cea a transformării protoplaştilor bacterieni cu vectori plasmidial specifici, motivul principal fiind acela că la streptomicete transformarea bazată pe starea de competență nu este posibilă. În cadrul experimentelor ce folosesc protoplaştii apar însă o serie de inconveniente ce țin, pe de o parte, de obținerea unor vectori de clonare specifici, de fragilitatea protoplaştilor în timpul lucrului sau, pe de altă parte, de existența în majoritatea tulpinilor de *Streptomyces* testate a unor sisteme de restricție care reduc frecvența de transformare cu un factor de cel puțin 10^3 (Hunter şi Friend, 1984). Utilizarea protoplaştilor ca acceptori ai moleculelor de ADN exogen reprezintă o modalitate eficientă de transformare a celulelor de *Streptomyces* şi presupune folosirea PEG (de obicei PEG 1000) într-o concentrație mai mică decât cea utilizată pentru fuziune (Hopwood şi colab., 1985). Parametrii ce influențează frecvența de transformare la streptomicete au fost studiați de numeroşi autori, pe mai multe specii, dovedindu-se că vârsta miceliului utilizat pentru protoplastizare, temperatura la care se realizează regenerarea, compoziția mediului de cultivare, concentrația şi conformația moleculară a ADN transformant influențează randamentul de transformare. O modalitate eficientă de introducere a ADN exogen în celulele de streptomicete este electrotransformarea. Cu toate acestea, experimentele de electrotransformare a protoplaştilor de *S.lividans* au evidențiat că frecvența de transformare este relativ redusă comparativ cu metoda ce

utilizează tratarea protoplaştilor cu PEG. În ultima vreme, experimentele de electrotransformare utilizează celulele intacte în locul protoplaştilor deoarece, în cazul acestora din urmă, manipulările sunt mai dificile ţinând cont de fragilitatea lor (Cornea, 1996).

Una dintre utilizările concrete ale streptomicetelor este reprezentată de clonarea şi prelucrarea genelor implicate în biosinteza antibioticelor în scopul obţinerii de tulpini capabile să sintetizeze cantităţi sporite de antibiotice naturale sau să producă antibiotice noi, hibride.

Antibioticele sunt molecule complexe, considerate ca metaboliţi secundari (adică nu sunt compuşi esenţiali pentru creşterea şi menţinerea celulelor), fiind produse într-o etapă specifică a cultivării bacteriilor producătoare, atunci când unul sau mai mulţi nutrienţi devin limitativi ai creşterii. Etapa de biosinteză a antibioticelor corespunde sfârşitului fazei exponenţiale de creştere, ele reprezentând produşi finali ai unor căi metabolice complexe, cu multe faze intermediare. Aceste faze sunt controlate strict de enzime specifice codificate de gene grupate la nivelul unor regiuni ale cromosomului bacterian, astfel că orice modificare la nivel genetic poate avea drept consecinţă fie blocarea procesului de biosinteză fie sinteza unui nou compus cu efect antibiotic sau a unui antibiotic înrudit. Primele tipuri de experimente au avut drept scop identificarea şi izolarea genelor de rezistenţă la antibiotice, gene care au fost apoi utilizate ca markeri de selecţie pentru construirea unor vectori de clonare specifici. Ulterior, interesul cercetătorilor s-a îndreptat spre genele implicate în biosinteza anumitor antibiotice, reuşindu-se clonarea a cel puţin 12 gene de acest tip (tabelul 6.8) (Hutchinson, 1988).

Cea mai simplă modalitate pentru a obţine cantităţi crescute de antibiotice de la anumite tulpini bacteriene este cea a izolării fragmentelor de ADN de la o tulpină producătoare şi clonarea lor în aceeaşi tulpină sau în alta ce sintetizează acelaşi antibiotic, după care se selectează coloniile transformate ce produc mai mult antibiotic (haloul de inhibare a creşterii unei tulpini sensibile este de dimensiuni mai mari) (Bibb, 1988). Această metodă este în întregime empirică dar este, în acelaşi timp şi practică cu condiţia existenţei unui procedeu eficient de screening semicantitativ. Metoda poate permite obţinerea unor rezultate mulţumitoare, deşi şansele sunt reduse, succesul bazându-se pe efectul de dozare a genelor (mai multe gene de biosinteză determină mai mult produs sintetizat) sau pe modificarea mecanismelor normale de reglare a biosintezei.

Tabelul 6.8

Principalele gene clonate, implicate în biosinteza antibioticelor la streptomicete

Antibioticul	Natura chimică	Specia producătoare
Actinomicina D	Oligopeptid	*Streptomyces antibioticus*
Acid clavulanic	β-lactam	*S.clavuligerus*
Actinorhodin	izocromat-quinonă	*S.coelicolor*
Bialafos	Peptid	S.hygroscopicus
Candicidin	Poliene	*S.griseus*
Eritromicina	Macrolide	*S.erythreus*
Tilozină	Macrolide	*S.fradiae*
Metilenomicină	Ciclopentan	*S.coelicolor*
Oxitetraciclină	Tetracene	*S.rimosus*
Puromicină	Nucleotid	*S.alboniger*
Tetracenomicină	Antraciclină	*S.glaucescens*
Streptomicină	aminoglicozid	*S.griseus*
Undecilprodigiosin	Polipirol	*S.coelicolor*

Biopolimerii sunt macromolecule sintetizate de diverse organisme, inclusiv microorganisme, ei având proprietăţi fizice şi chimice specifice care determină utilizarea în industria alimentară sau în cea farmaceutică. Aplicarea metodelor moleculare permite modificarea unora dintre aceste proprietăţi, mărind în acest fel domeniile de utilizare şi micşorând preţul de cost. *Xanthomonas camperstris* este o bacterie Gram negativă aerobă capabilă să sintetizeze un exopolizaharid cu masă moleculară mare (format din monomeri de glucoză şi resturi de acid glucuronic şi manoză) care a primit denumirea de xantan şi care are numeroase utilizări. Pentru ca procesul de obţinere să fie eficient este nevoie nu numai de tulpini bune producătoare ci şi de condiţii de cultură simple, inclusiv medii de cultură ieftine. Pornind de la aceste considerente s-a examinat posibilitatea cultivării tulpinilor bacteriene selectate pe medii ce conţin ingrediente ieftine, aşa cum este zerul (deşeu rezultat în procesul de obţinere a diverselor produse lactate). Problema apărută este aceea că *X.campestris* nu poate utiliza lactoza ca sursă de carbon astfel că tulpinile bacteriene de interes au fost supuse unor experimente de modificare genetică. In acest scop, genele *lacZ* şi *lacI* implicate în sinteza β-galactozidazei, izolate de la *E.coli*, au fost clonate într-un vector specific pentru *Xanthomonas* sub controlul uni promotor specific acestor bacterii (promotor derivat de la un bacteriofag caracteristic bacteriilor din genul *Xanthomonas*). Rezultatele obţinute au fost spectaculoase: transformanţii cultivaţi în mediu cu 10% zer produc 4.241 μg xantan/ml cultură comparativ cu martorul netransformat care sitetizează 224 μg xantan/ml mediu (Fu şi Tseng, 1990).

Melaninele aparţin unei familii heterogene de biopolimeri ce absorb radiaţiile luminoase, sintetizate în principal de animale dar şi de plante şi unele microorganisme. Aceste substanţe pot fi utilizate ca aditivi în diferite produse cosmetice sau diferite materiale de protecţie solară pentru plastice astfel că producerea unor cantităţi mari din asemenea biopolimeri cu proprietăţi corespunzătoare şi la un preţ redus constituie un obiectiv al cercetărilor de inginerie genetică în domeniu. Melaninele sunt alcătuite din o serie de monomeri cum ar fi aminoacizi, indoli sau benztiazoli, biosinteza lor făcându-se în mai multe etape dintre care prima presupune oxidarea tirozinei la dihidroxifenilalanil chinonă, iar ultimele faze ale polimerizării sunt nonenzimatice, produşii finali putând fi de culoare neagră, maro, galbenă, roşie sau violet. Prin identificarea şi apoi clonarea genelor implicate în sinteza melaninei de la bacteriei *Streptomyces antibioticus* (una dintre gene codificând biosinteza tirozinazei iar o alta notată ORF438 având funcţii neclare, probabil legate de asigurarea de ioni de cupru necesari activării precursorului inactiv al tirozinazei) în vectori de exprimare pentru *E.coli* (figura 6.53) s-au obţinut clone recombinate capabile de sintetiza melanine cu diferite proprietăţi prin adăugarea unor compuşi variaţi în mediu (Ciopa şi colab., 1990).

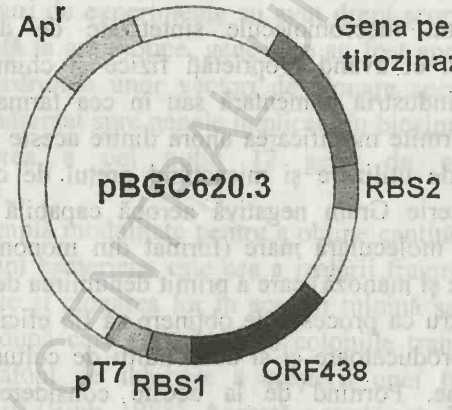


Figura 6.53. Vector de exprimare recombinant pentru *E.coli* ce conţine cele două gene implicate în biosinteza melaninei clonate sub controlul promotorului p^{T7} şi care prezintă situsuri de legare la ribosomi diferite (RBS1 şi RBS2)

Îndepărtarea petelor de grăsime este o problemă cu care se confruntă industria detergenţilor astfel că utilizarea unor enzime lipolitice capabile să îşi menţină activitatea în condiţiile unor temperaturi ridicate şi ale unui pH alcalin constituie o condiţie esenţială obţinerii unor produse eficiente, cu preţ convenabil. **Lipazele** microbiene cum ar fi cele produse de *Pseudomonas alcaligenes* reprezintă o variantă promiţătoare dar, din păcate, tulpinile de tip sălbatic sintetizează cantităţi scăzute fiind necesară prelucrarea lor genetică. Genele

implicate în sinteza lipazei au fost izolate de la *P.alcaligenes* și prelucrate astfel încât s-a obținut o genă hibridă formată din două secvențe notate *lipA* și *lipB* (figura 6.54), aceasta fiind clonată în diferite tipuri de vectori de clonare. Folosirea vectorilor cu număr mic de copii a permis obținerea unor cantități de lipază de 4-5 ori mai mari la transformanți comparativ cu tulpina de tip sălbatic; atunci când s-au utilizat vectori de clonare cu număr mare de copii per celulă, cantitatea de lipază sintetizată de transformanți a fost de peste 35 ori mai mare (Geriitse și colab., 1998).

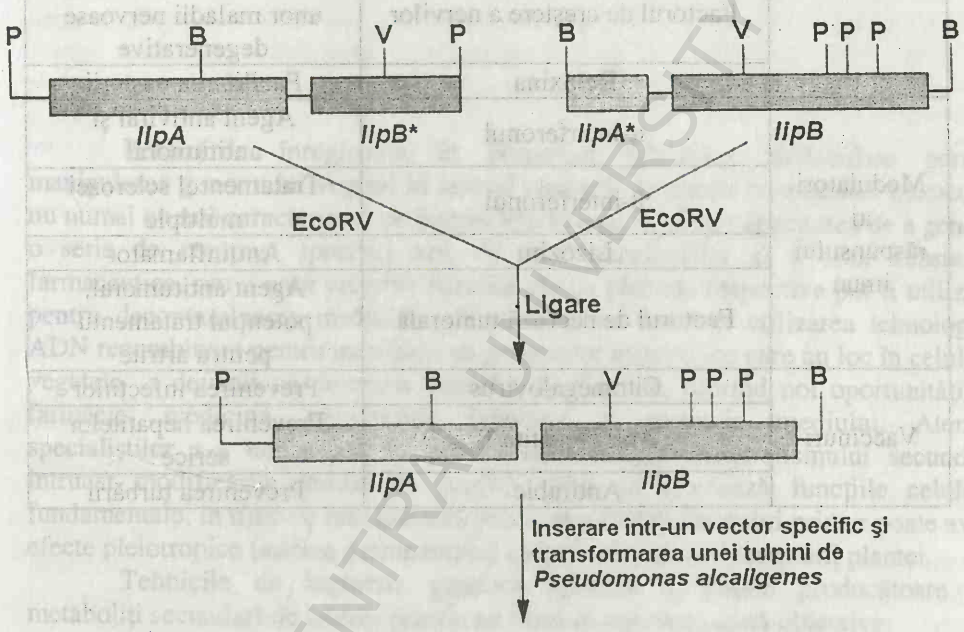


Figura 6.54. Schema obținerii genei hibride pentru lipaza de la *P.alcaligenes*

Cu toate performanțele înregistrate „in vitro", atunci când tulpinile recombinate au fost utilizate la scară industrială, rezultatele au fost departe de fi satisfăcătoare probabil datorită producerii în mediul de cultură a unor cantități prea mari de dioxid de carbon care nu au putut fi îndepărtate eficient.

Departe de a epuiza aplicațiile tehnologiei ADN recombinant în cazul microorganismelor de interes industrial, exemplele prezentate ilustrează nivelul la care s-a ajuns la nivel industrial: rezultatele sunt spectaculoase la nivel de laborator dar aplicate la scară industrială, în general, ele încă mai suportă optimizare. Există și excepții în care microorganismele recombinate sunt utilizate pentru producerea unor substanțe biologic active deja comercializate (vaccinuri, hormoni, enzime etc)(tabelul 6.9).

Tabelul 6.9

Produse terapeutice obținute prin utilizarea tehnologiei ADN recombinant (după Madigan și colab., 1997)

Produsul		Funcția
Hormoni umani	Factorul de creștere epidermal	Vindecarea rănilor
	Hormonul uman de creștere	Tratamentul nanismului hipofizar
	Insulina	Tratarea diabetului
	Factorul de creștere a nervilor	Tratamentul posibil al unor maladii nervoase degenerative
	Relaxina	Facilitarea nașterii
Modulatori ai răspunsului imun	α-interferonul	Agent antiviral și antitumoral
	β-interferonul	Tratamentul sclerozei multiple
	Lizozim	Antiinflamator
	Factorul de necroză tumorală	Agent antitumoral, potențial tratamentu pentru artrite
Vaccinuri	Citomegalovirus	Prevenirea infecțiilor
	Anti Hepatita B	Prevenirea hepatitelor serice
	Antirabic	Prevenirea turbării

BCU IAȘI / CENTRUL UNIVERSITAR

7. PROGRESE ÎN INGINERIA GENETICĂ VEGETALĂ - INGINERIA METABOLICĂ -

Realizările înregistrate în domeniul tehnicilor moleculare permit manipularea genomului vegetal în scopul obţinerii de plante transgenice înzestrate nu numai cu noi caracteristici de interes agronomic, ci şi cu capacitatea de a genera o serie de compuşi specifici noi, de tipul vaccinurilor şi a altor substante farmaceutice, sau a unor proteine datorită cărora plantele respective pot fi utilizate pentru decontaminarea mediului poluat. În acest context, utilizarea tehnologiei ADN recombinant pentru manipularea proceselor metabolice care au loc în celulele vegetale a devenit un domeniu deosebit de dinamic, oferind noi oportunităţi în farmacie, medicină, agricultură, industrie şi protecţia mediului. Atenţia specialiştilor s-a concentrat în primul rând asupra metabolismului secundar, întrucat modificările induse în această sferă nu afectează funcţiile celulare fundamentale, în timp ce manipularea proceselor metabolismului primar poate avea efecte pleiotropice (adesea detrimentale) asupra creşterii şi dezvoltării plantei.

Tehnicile de inginerie genetică aplicate la plante producătoare de metaboliţi secundari de interes practic au vizat în principal două obiective:

- obţinerea de culturi de organe transgenice de tipul rădăcinilor firoase şi a teratoamelor caulinare în scopul producerii stabile de metaboliţi specifici în ţesuturile şi organele cultivate „in vitro";
- transferul şi exprimarea unor gene străine la specii gazdă, în scopul modificării proceselor metabolice ale acestora.

7.1. STRATEGII GENERALE ÎN TRANSGENEZA VEGETALĂ

Ingineria genetică realizează modificarea deliberată a genomului plantelor prin transferul şi exprimarea funcţională a unui material genetic care nu este prezent în organismul gazdă în condiţii naturale, provenit din diferite sisteme

biologice (plante neînrudite taxonomic, microorganisme, animale). Noile combinaţii de material ereditar se obţin prin intervenţii caracterizate printr-un înalt grad de precizie, la nivelul moleculelor de acizi nucleici, fapt ce justifică denumirea de „inginerie genetică" atribuită acestui domeniu al ştiintei moderne, cu rezultate practice dintre cele mai spectaculoase.

Introducerea şi exprimarea genelor străine la plante ridică unele probleme tehnice cu care nu se confruntă sistemele microbiene. Spre deosebire de bacterii, plantele nu pot în mod normal să-şi exprime genele din mesaje policistronice, fapt ce impune precauţii în plus pentru a realiza coordonarea exprimării însuşirilor complexe care implică transgene multiple. Totodată celulele vegetale au organite care nu sunt prezente în celulele microorganismelor sau ale mamiferelor, în acest caz fiind mai complicată compartimentalizarea şi localizarea produşilor genici. Plantele dispun şi de organe diferenţiate şi specializate, la nivelul cărora procesele fiziologice şi expresia genică diferă dramatic. În plus, desfăşurarea temporală a proceselor dezvoltării influenţeaza în mare măsura momentul când genele sunt active, iar dacă plantele transgenice sunt cultivate în câmp, se adaugă un grad ridicat de variabilitate şi de hazard care nu se întâlneşte în sistemele – fermentator. Chiar daca o plantă transgenică este foarte bine caracterizată în anumite condiţii experimentale, odată transferată în câmp este expusă la perturbări ale condiţiilor de mediu care pot afecta negativ acumularea produsului metabolic scontat. În consecinţă sunt necesare strategii diferite pentru introducerea şi controlul exprimării genelor străine, astfel încât să fie generate plante complet transgenice, la care genele străine să se exprime prin produşi genici stabili pe parcursul mai multor ani (Philip Lessard şi colab., 2002).

O serie de metode de transformare elaborate în ultimii ani garantează realizarea transferului genic la multe specii de interes economic (Tabelul 7.1).

Cu toate că prin metodele comune de transformare se obţin cu uşurinţă niveluri ridicate ale expresiei genice tranzitorii la plante, realizarea transformării stabile ridică dificultăţi, iar gene identice pot avea un comportament diferit în celulele transformate tranzitoriu, comparativ cu celulele transformate stabil.

Eficienţa strategiei de transformare trebuie să fie evaluată şi în funcţie de efectele expresiei transgenice în ţesuturile mature ale florilor şi fructelor, aspecte care, la speciile lemnoase perene, pot dura mulţi ani.

Tabelul 7.1.

Strategii comune pentru introducerea genelor străine în celulele vegetale

Procedeul de transformare	Avantaje	Dezavantaje
Mediat de Agrobacterium	Foarte eficace, simplu, necostisitor şi poate fi utilizat în transformarea liniilor germinale. Numărul de copii ale inserţiilor ADN este adesea scăzut.	Necesită un procedeu de regenerare în vitro. Gama speciilor gazdă poate fi limitată de răspunsul hipersensibil al plantei.

Bombardarea cu particule	Foarte eficace pentru exprimarea tranzitorie. A fost utilizat pentru obținerea de plante transplanstomice. Nu ridică probleme privind gama speciilor gazdă.	Necesită un procedeu de regenerare in vitro. Numărul de copii ale inserțiilor ADN poare fi ridicat și conduce la silențiere genică/cosupresie.
Electroporare	Foarte eficace pentru exprimare tranzitorie. Nu ridică probleme privind gama speciilor gazdă. Rata ridicată a introducerii ADN.	Necesită un procedeu de regenerare in vitro. Numărul de copii ale inserțiilor ADN poate fi ridicat și conduce la silențiere genică/cosupresie

7.1.1. Transformarea genetică prin intermediul vectorilor

Succesul transferului genic presupune realizarea stabilă a patru procese fundamantale: introducerea, integrarea, replicarea și exprimarea materialului genetic străin în celula gazdă.

Cercetările de început vizând transferul de ADN străin în protoplaștii plantelor s-au confruntat cu degradarea frecventă a ADN „nud" de către nucleazele celulei receptoare. Perfecționarea sistemelor de transformare a impus utilizarea unor vectori genici, meniți să faciliteze incorporarea ADN străin în celula receptoare și să asigure stabilitatea acestuia. În prezent, două tipuri de vectori au o largă utilizare în transgeneză: plasmidele bacteriene și unele virusuri.

7.1.1.1. Sistemul plasmidial de transformare genetică

Un sistem plasmidial unic care se bucură de o largă utilizare în transgeneză este cel al bacteriei inductoare de tumori la plante, *Agrobacterium tumefaciens*. Plasmida Ti, responsabilă de proprietățile oncogene ale bacteriei reprezintă un sistem vector natural și servește ca model pentru transferul și integrarea unor gene străine în genomul celulelor plantelor, fiind un exemplu de inginerie genetică realizată pe cale naturală.

Încă de la începutul secolului trecut E.F. Smith și C.O. Townsend (1907) au demonstrat că *Agrobacterium tumefaciens* este agentul infecțios care produce tumori la plante. După 1950 s-a demonstrat că celulele acestor tumori pot crește „in vitro" în absența fitohormonilor administrați exogen (Braun A.C., 1958). În această perioadă a început și descrierea compușilor eliberați de celulele tumorale și pe care bacteria îi utilizează ca nutrienți. De un larg interes s-a bucurat în lumea specialiștilor descoperirea că tumorigeneza are drept cauză transferul unor fragmente de ADN oncogenic în celulele plantei infectate, care produc anumite semnale chimice, și că acest proces a evoluat dintr-un sistem de transfer prin

conjugare (S.E. Stachel şi P.C. Zambryski, 1986). Aceste cercetări au făcut ca genul *Agrobacterium* să devină un model excelent pentru studiul interacţiei gazdă-patogen şi în acelaşi timp un instrument fascinant pentru realizarea transformării genetice în scopuri practice.

Tulpinile virulente ale bacteriei Gram-negative din sol, *Agrobacterium tumefaciens*, induc la plantele superioare, mai ales la angiospermele dicotiledonate, o boală neoplasmică, sub forma tumorilor „crown gall" (CGT). În timpul infecţiei, care se produce în zonele rănite ale coletului plantelor, copia unui segment de ADN bacterian este transferată în nucleul celulelor gazdă cu o extraordinară abilitate, este integrată stabil în genomul acestora şi transcrisă, realizând astfel fenomenul de transformare genetică pe cale naturală a celulelor infectate. Acest segment, numit ADN-T (de transfer), face parte din structura unei plasmide specifice, numită plasmida Ti (inductoare de tumori), care este prezentă numai la un mic procent al bacteriilor care constituie populaţiile naturale de *Agrobacterium tumefaciens* din sol. Există şi tulpini saprofite, lipsite de plasmida Ti, dar orice tulpină poate primi plasmida prin transconjugare devenind virulentă.

Plasmidele bacteriene constau din ADN extracromozomal, dublu catenar şi circular inchis, care se replică independent de cromozomul bacterian, dar se pot integra în acesta.

În organizarea unei plasmide (Figura 7.1) există două regiuni distincte:

1. – segmentul ADN–T care conţine gene ce nu se exprimă în celula bacteriană, şi anume:

- genele „onc", a caror expresie constă din sinteza unor niveluri ridicate de fitohormoni (auxine – acidul indolil acetic şi citochinine – zeatin ribozid) al căror efect este stimularea diviziunilor celulare care conduc la dezvoltarea tumorii;
- genele responsabile pentru sinteza opinelor, ca substrat metabolic al bacteriei;
- la stânga (L) şi la dreapta (R) regiunii de transfer se află câte o secvenţă de 25 nucleotide, direct repetată, acestea constituind singurele elemente „cis" care acţionează ca semnal pentru aparatul de transfer;

2. – o regiune de 30 kb care controlează virulenţa, reprezentând un regulon organizat in 7 operoni (vir A,B,C,D,E,F,G), cu rol esenţial în transferul ADN-T.

Tot în afara segmentului ADN-T plasmida Ti mai conţine gene pentru catabolizarea opinelor produse de celulele vegetale transformate, gene care controlează transferul conjugativ al plasmidei între celulele bacteriene şi gene care-i asigură propria integritate şi stabilitate.

Plasmida Ti conţine 155 cadre deschise de citire (ORFs) care codifică proteine funcţionale, şi putem spune că prezintă o structură modulară, întrucât genele cu funcţii similare sunt grupate împreună. Astfel, genele care sunt transferate în celula gazdă şi care sunt responsabile de tumorigeneză se află numai în regiunea T; genele grupate în regiunea *vir* controlează procesarea şi transferul ADN-T; genele aflate în regiunea *rep* sunt implicate în replicarea plasmidei Ti;

locii *tra* şi *trb* au rol în transferul prin conjugare al plasmidei Ti; o regiune distinctă conţine genele care direcţioneaza preluarea şi catabolizarea opinelor (J. Zhu şi colab., 2000).

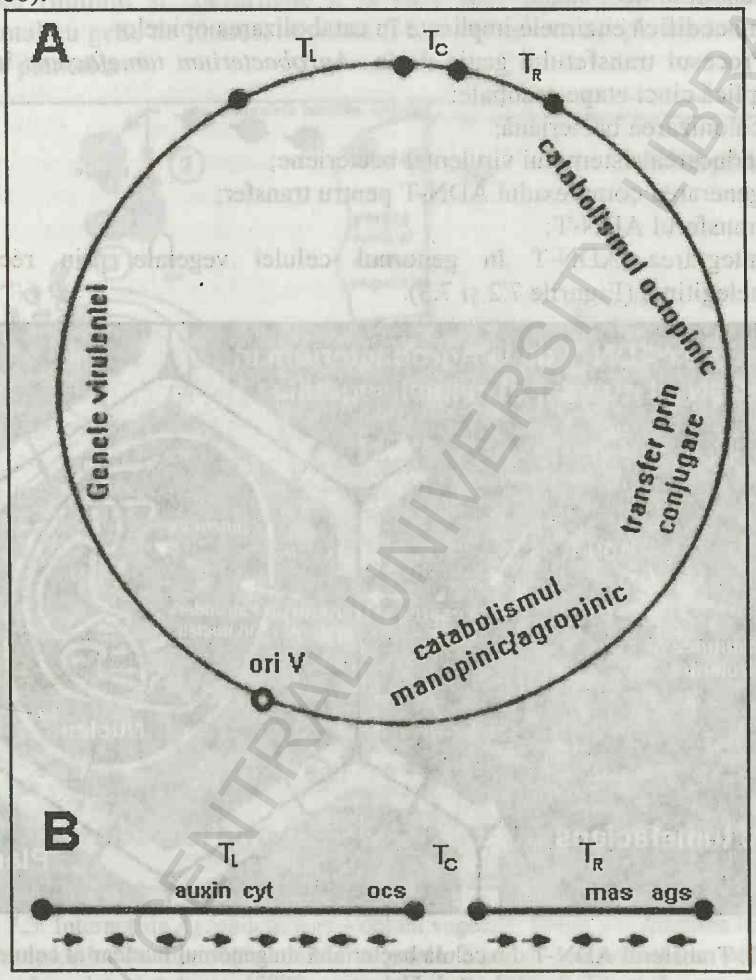


Figura 7.1. Reprezentare schematică a unei plasmide Ti de tip octopinic (A) şi a regiunii ADN-T (B). ADN-T este divizat în 3 regiuni: TL – stânga, TC – centrală şi TR – dreapta, delimitate de secvenţele direct repetate; oriV reprezintă originea replicării plasmidei Ti; B – sunt reprezentaţi diferiţii transcripti codificaţi de genele ADN – T: genele implicate în sintezele de auxine (auxin), de citochinine (cyt), de opine octopinice (ocs), de mannopine (mas) şi de agropine (ags), iar săgeţile indică direcţia transcrierii (după S.B. Gelvin, 2003).

În timp ce dimensiunea plasmidei Ti variază de la 200 la 800 kbp, ADN-T are dimensiuni de aproximativ 10 – 30 kbp, această regiune reprezentând mai puţin de 10% din dimensiunea totală a plasmidei. Unele plasmide Ti conţin regiuni T multiple. Principalele caracteristici ale ADN –T constau din:

- nu codifică pentru compuşii care mediază transferul sau;

- codifică enzimele pentru sinteza reglatorilor creşterii – auxine şi citochinine, a căror sinteză în celulele vegetale transformate are ca rezultat fenotipul neoplastic;
- nu codifică enzimele implicate în catabolizarea opinelor.

Procesul transferului genic de la *Agrobacterium tumefaciens* în celulele gazdă implică cinci etape esenţiale:

- colonizarea bacteriană;
- inducerea sistemului virulenţei bacteriene;
- generarea complexului ADN-T pentru transfer;
- transferul ADN-T;
- integrarea ADN-T în genomul celulei vegetale prin recombinare nelegitimă (Figurile 7.2 şi 7.3).

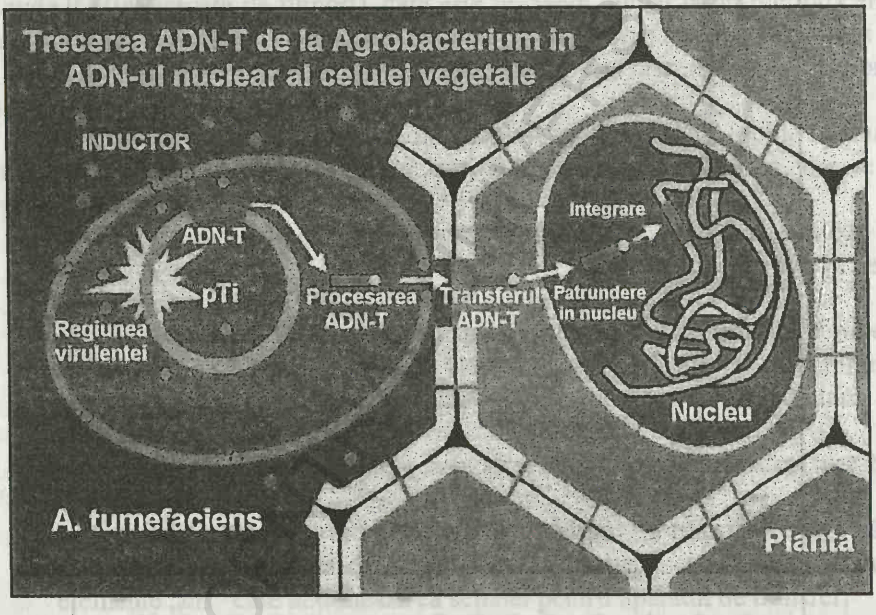


Figura 7.2. Transferul ADN-T din celula bacteriană în genomul nuclear al celulei vegetale (după L.Valentine, 2003).

În ceea ce priveşte elementul ADN-T, structura acestuia variază la diferite tipuri de plasmide. În timp ce la plasmidele Ti de tip nopalinic ADN-T constă dintr-o secvenţă continuă de ~ 22 kb, la plasmidele octopinice segmentul ADN-T este alcătuit din trei secvenţe adiacente transportate independent: stânga (13 kb), centrală (1,5 kb) şi dreaptă (7,8 kb). Secvenţele „border" (L şi R) care delimitează în partea stânga şi respectiv dreapta segmentul ADN-T (Fig.1) constau din 25 bp, iar studiile genetice bazate pe mutante de deleţie au evidenţiat faptul că numai limita dreaptă (R) este absolut necesară pentru patogenitatea bacteriei, ceea ce sugerează că transferul ADN-T este polar, de la dreapta la stanga, şi este orientat de secvenţa „border" dreaptă a ADN-T. Interesant este faptul că segmentul ADN-T

propriu–zis cuprins între secvenţele „border" nu are efect asupra eficienţei transferului, şi tocmai această caracteristică a permis ca plasmidele non-oncogenice (numite şi „dezarmate"), la care secvenţele ADN-T sunt înlocuite experimental cu gene de interes, să poată fi folosite ca vectori pentru transformarea genetică a plantelor.

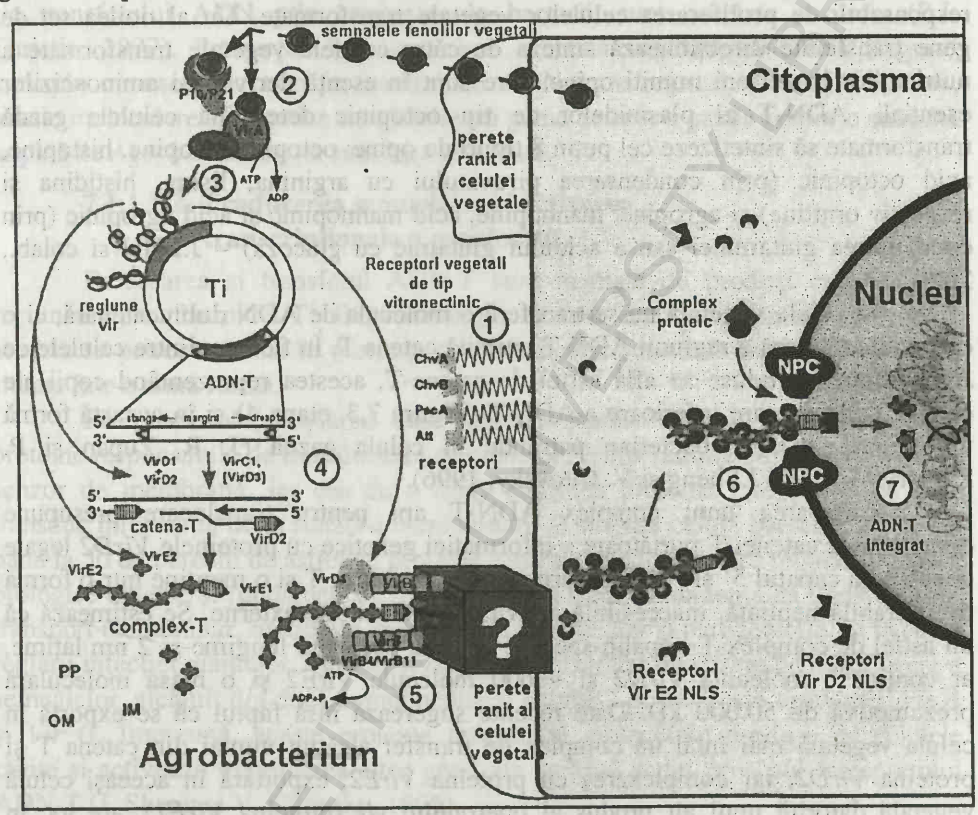


Figura 7.3. Interacţiile *Agrobacterium* – celulă vegetală; Etapa 1 – Ataşarea bacteriei în zona receptorilor de suprafaţă ai celulei vegetale; Etapa 2 – recunoaşterea moleculelor semnal de către sistemul de transducţie a semnalelor *VirA/VirG*; Etapa 3 – activarea genelor *vir* bacteriene; Etapa 4 – producerea unei catene–T transferabile; Etapa 5 – formarea complexului–T şi transportul acestuia în celula vegetală; Etapa 6 – importul nuclear al complexului–T; Etapa 7 – integrarea ADN în genomul nuclear al celulei vegetale (după J. Sheng şi V. Citovski, 1996).

IM – membrana bacteriană internă
OM – membrana bacteriană externă
NPC – complexul porului nuclear
PP – periplasma bacteriană

Genele cuprinse în segmentul ADN-T codifică pentru 13 proteine. Regiunile netranscrise ale fiecărei gene transferate posedă elemente specifice genelor vegetale, cum sunt casetele TATA şi CAAT tipic eucariote, stimulatorii

transcripţionali şi situsuri de adiţie poly(A). Nu au fost descrişi introni în cazul genelor transferate de la *Agrobacterium tumefaciens,* iar regiunile codificatoare ale ADN-T au un conţinut de G+C de aproximativ 50%.

Un grup de gene ale ADN-T direcţionează producerea fitohormonilor (auxine: acid indolil acetic şi citochinine: zeatina şi isopentenil adenina) responsabili de proliferarea celulelor vegetale transformate. Un al doilea set de gene transferate direcţionează sinteza de către celulele vegetale transformate a nutrienţilor bacterieni numiti opine, care sunt în esenţă derivaţi ai aminoacizilor esenţiali. ADN-T al plasmidelor de tip octopinic determină celulele gazdă transformate să sintetizeze cel puţin 8 tipuri de opine: octopine, lisopine, histopine, acid octopinic (prin condensarea piruvatului cu arginina, lisina, histidina şi respectiv ornitina) şi agropine, mannopine, acid mannopinic şi acid agropinic (prin condensarea glutaminei sau a acidului glutamic cu glucoza) – J.ZHU si colab., 2000.

În celula vegetală nu se transferă o molecula de ADN dublucatenară, ci o copie unicatenară a regiunii ADN-T, numită catena T. În fiecare dintre celulele de *Agrobacterium* induse se află astfel de catene-T, acestea reprezentând copii ale catenei codificatoare inferioare a ADN-T (Figura 7.3, etapa 4) şi în această formă unicatenară ADN-T bacterian patrunde în celula gazdă (J. R. Zupan şi P. Zambryski, 1995; J.Sheng şi V. Citovsky, 1996).

Generarea unui complex ADN-T apt pentru translocare presupune complexarea catenei T purtătoare a informaţiei genetice cu proteinele *VirD2* legate covalent la capatul 5' şi *Vir E2*, care protejează catena T şi o menţine într-o formă transferabilă nepliată, inaccesibilă activităţii nucleolitice externe. Se estimează că un astfel de complex-T nopalin-specific ar avea 3600 nm lungime şi 2 nm lăţime, ar conţine o moleculă *VirD2* şi ~ 600 molecule VirE2 şi o masă moleculară prezumptivă de 50.000 kD. Date recente sugerează însă faptul că se exportă în celula vegetală mai întâi un complex de transfer alcătuit numai din catena T şi proteina *VirD2*, iar complexarea cu proteina *VirE2*, exportată în aceeaşi celulă vegetală datorită unui alt produs al operonului *vir* (proteina *VirE1*), are loc în citoplasma celulei gazda (P.J. Christie, 1997). Este posibil ca un alt rol important al proteinei *VirE2* să fie acela de a forma un por în membrana plasmatică a celulei vegetale care să faciliteze trecerea catenei T (S.B. Gelvin, 2003).

7.1.1.1.1. Recunoaşterea şi colonizarea

În condiţii naturale infecţia începe cu ataşarea bacteriei de o celulă vegetală a ţesutului rănit, etapă numită a colonizării bacteriene. În acest proces, care se desfăşoară în două trepte, se pare că celula vegetală este un partener pasiv, un rol important avându-l genele situate la locii *chvA, chvB, chvE, cell* şi *att* ai cromosomului bacterian (Figura 7.3, etapa 1). Mai întâi bacteria acţionează prin secreţia unor polizaharide ca beta-1-2 glucan şi succino-glucan, cu rol în prima fază a procesului de ataşare, după care bacteria sintetizează filamente de celuloză, care stabilizează şi realizează o asociere strânsă între *Agrobacterium* şi celula gazdă. Se bănuieşte şi existenţa unor receptori la suprafaţa celulei vegetale implicaţi în fenomenul de recunoaştere, care s-ar asemăna cu moleculele de

vitronectină specifice matricei extracelulare a celulelor animale, ca şi alte proteine de suprafaţă şi carbohidraţi, dar identitatea acestor molecule urmează să fie demonstrată (J.Sheng şi V. Citovski, 1996).

În prezent s-au acumulat numeroase date în sprijinul ipotezei conform căreia mecanismele transferului ADN de la *Agrobacterium* în celulele vegetale şi ale transferului ADN prin conjugare la bacterii, sunt corelate evolutiv (P.J. Christie, 1997). Interacţia *Agrobacterium* – celula vegetală este însă singurul exemplu cunoscut de transfer natural de ADN între regnuri. Cu toate acestea, bazele moleculare şi genetice care limitează gama de specii gazdă pentru o anumită tulpină de *Agrobacterium* nu sunt încă elucidate.

7.1.1.1.2. Traducerea semnalelor şi activarea transcriptionala a genelor *vir.*

Procesarea şi transferul ADN-T sunt mediate de produşi codificaţi de regiunea *vir* a plasmidei Ti. Exprimarea genelor *vir* este strict reglată astfel încât aceasta se petrece numai în prezenţa ţintei infecţiei, constând din celulele plantei situate într-o zonă rănită.

La procariote, cuplarea între semnal-răspuns implică două familii de proteine responsabile de transducerea semnalelor. Prima familie cuprinde proteine–senzor de membrană, iar cea de a doua cuprinde proteine citoplasmatice care transduc informaţia de la senzorii membranari. O singură celulă bacteriană conţine până la 50 de perechi de astfel de proteine senzor-transductor care reglează procese biologice diverse şi fundamentale, precum sporularea, competenţa de transformare, transport membranar, motilitate, metabolism intermediar şi patogenitate. Şi în cazul reglării infecţiei plantelor, *Agrobacterium* şi-a dezvoltat un sistem de transducere a semnalelor alcătuit din două componente, şi anume 2 proteine ale virulenţei, *Vir A* şi *Vir G.* Împreună, aceste proteine receptează moleculele produse de celulele rănite şi activează exprimarea altor gene *vir*, iniţiind astfel procesul transportului ADN-T (J. Sheng şi V. Citovsky, 1996).

În ceea ce priveşte compuşii cu rol de semnal din partea celulelor rănite, acestea elimină un exudat celular cu un conţinut scăzut în fosfaţi, cu pH acid caracteristic (5,0 – 5,8) şi cu un conţinut ridicat în diferiţi compuşi fenolici de tipul ligninei şi al precursorilor flavonoidici, care stimulează în mod specific expresia genelor *vir* ale bacteriei (Figura 7.3, etapa 2). Între aceşti compuşi inductori ai genelor *vir* foarte bine caracterizaţi sunt fenolii monociclici de tipul acetosiringonului. Aceste molecule fie nu sunt detectate, fie se află în concentraţii foarte scăzute în celulele intacte, dar concentraţia lor creşte semnificativ în celulele vegetale din zonele rănite ale plantei. Este interesant de menţionat că şi alte tipuri de interacţii plantă – microorganism sunt iniţiate prin intermediul unor compuşi fenolici specifici prezenţi în exudatele plantei gazdă. De exemplu, flavonoizi precum luteolina şi chalcona induc genele nodulării de la *Rhizobium*, proces necesar pentru stabilirea asocierii simbiotice dintre bacterie şi plantele leguminoase.

Atunci când fenolii din exudatele celulelor rănite se află în cantităţi prea mici, rolul lor este compensat prin sinteza unor monozaharide, ca glucoza şi galactoza, care de asemenea stimulează exprimarea genelor *vir*, acţionând sinergic cu compuşii fenolici.

Ca regulă generală, condiţiile care promovează inducerea genelor *vir* nu sunt optime pentru creşterea bacteriei, în timp ce condiţiile care stimulează creşterea vegetativă a bacteriei nu sunt potrivite pentru inducerea genelor *vir*. Prin urmare, în mediul creat în zona de rănire a plantei, unde concentraţia opinelor este scăzută, *Agrobacterium* se află în stare optimă pentru inducerea genelor *vir* şi transferul ADN-T. Concentraţia ridicată în opine produse de celulele vegetale din structura tumorilor mature restaurează creşterea vegetativă a bacteriei, prin utilizarea opinelor ca surse de carbon şi de azot.

Cu toate că moleculele fenolice inductoare sunt necesare pentru iniţierea transportului ADN-T, în concentraţii ridicate aceşti compuşi au efect bacteriostatic. În consecinţă, se presupune că un locus din regiunea *vir*, numit *vir H*, este implicat în inactivarea compuşilor fenolici vegetali în exces.

Proteinele *Vir A* şi *Vir G* funcţionează ca părti cooperante ale sistemului senzor-semnal de reglare a transducţiei. *Vir A* este o proteină-senzor dimerică transmembranară, funcţionând ca o adevarată „antenă" periplasmică pentru perceperea compuşilor fenolici prezenţi în exudatul de la locul de rănire. În cooperare cu transportorul monozaharidic *ChvE* şi în prezenţa unei concentraţii optime a moleculelor glucidice şi fenolice, *Vir A* se autofosforilează, iar ulterior transfosforilează proteinele *Vir G*. În timp ce în stare nefosforilată proteinele *Vir G* sunt inactive, ca urmare a fosforilarii aceste proteine devin foarte stabile şi activeaza sau sporesc nivelul transcriptional al restului genelor *vir*, probabil prin interacţia cu secvenţele casetei *vir* care constituie parte componentă a promotorilor genelor *vir* (G. de la Riva şi colab., 1998; S.B. Gelvin, 2003).

Activarea sistemului *vir* depinde şi de factori externi ca temperatura şi pH. La temperaturi mai mari de 32 grade C genele vir nu se exprimă, datorită unei modificări conformaţionale în plierea moleculelor proteinei *VirA*. Acest aspect trebuie avut în vedere în experimentele de cocultivare ale *Agrobacterium* cu celulele vegetale, astfel că în primele zile ale procesului de transformare acestea să fie menţinute la temperaturi mai scăzute (18 – 20 grade C).

Formele active fosforilate ale proteinelor *VirG* coordonează exprimarea unui set de cel puţin şase operoni ai virulenţei, implicaţi în constituirea aparatului de transfer al catenei T în celula vegetală, prin interacţiunea cu o secvenţă conservată de 12 bp (TNCAATTGAAAPy) din regiunea promotorului genelor *vir* înalt inductibile.

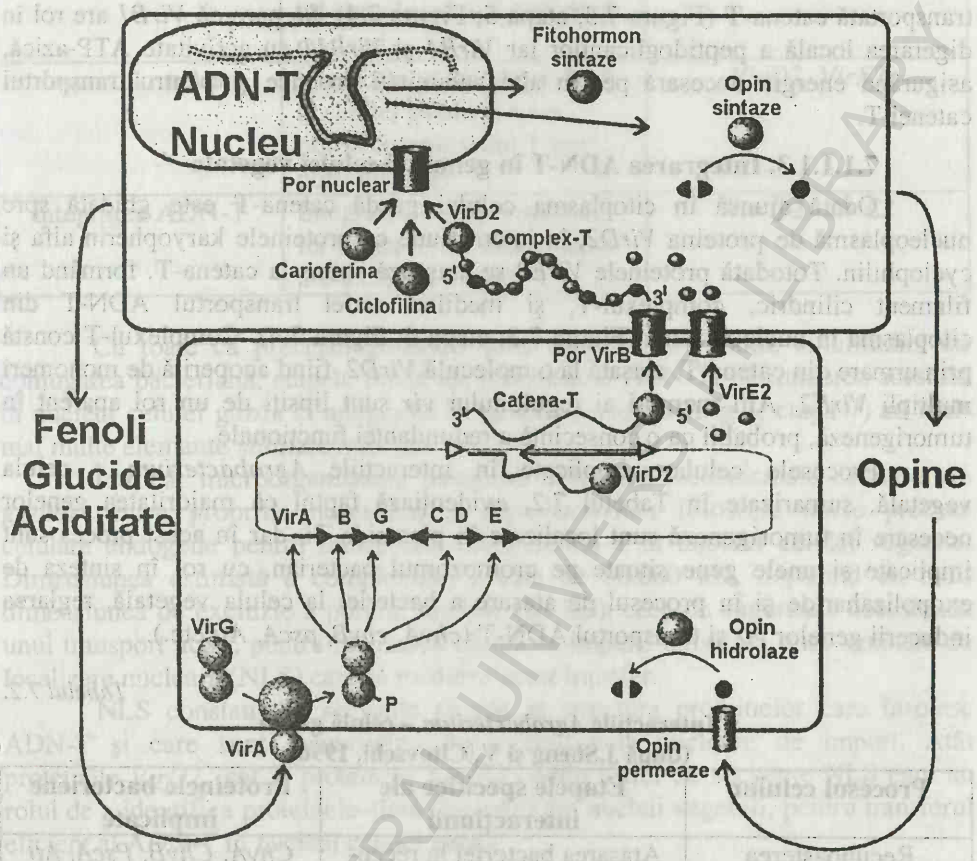


Figura 7.4. Schimbul de semnale chimice între *A. tumefaciens* şi celula vegetală. Stimulii chimici sunt percepuţi de proteinele *VirA/VirG*, rezultatul fiind transcrierea promotorilor *vir*. ADN-T este procesat de proteina *VirD2*, se formează catena -T lineară iar aceasta, împreună cu proteina *Vir E2* sunt translocate din celula bacteriană prin intermediul unui por codificat de operonul *virB* şi formează complexul-T în citoplasma celulei vegetale. Complexul-T este transportat în nucleoplasmă prin intermediul proteinei–gazdă *karyopherin alpha,* iar ADN-T este integrat în ADN-ul genomic (dupa J. Zhu si colab., 2000).

Proteinele *VirD1* şi *VirD2* funcţionează împreună ca endonucleaze cu specificitate de situs, determinând clivarea catenei inferioare a ADN-T în zona „border" din partea dreapta, după care, datorită mecanismelor celulei bacteriene de sinteză ADN şi a celor reparatorii este eliberată din plasmida Ti o copie unicatenară a ADN-T (Figura 7.3, etapa 4). *Vir D1* este acum eliberată, în timp ce *Vir D2* rămâne ataşată covalent la capatul 5' al catenei-T.

Aparatul de transfer al ADN-T este codificat de cele 11 gene care alcătuiesc operonul *virB*. Proteinele *VirB* sunt implicate în tumorigeneză, au fost localizate pe membranele interne sau exterioare şi ca urmare se presupune că în cea mai mare parte ele sunt implicate în formarea unui canal multiproteic prin care este

transportată catena-T (Figura 7.3, etapa 5; Figura 7.4). Se pare că *VirB1* are rol în digerarea locală a peptidoglicanilor iar *VirB4* şi *VirB11* au activitate ATP-azică, asigurând energia necesară pentru alte subunităţi proteice şi pentru transportul catenei-T.

7.1.1.1.3. Integrarea ADN-T în genomul celulei vegetale

Odată ajunsă în citoplasma celulei gazdă catena-T este ghidată spre nucleoplasmă de proteina *VirD2*, în interacţiune cu proteinele karyopherin alfa şi cyclophilin. Totodată proteinele *VirE2* se ataşează strâns la catena-T, formând un filament cilindric, complexul-T, şi mediind astfel transportul ADN-T din citoplasmă în nucleoplasmă (Figura 7.3, etapa 6; Figura 7.4). Complexul-T constă prin urmare din catena-T ataşată la o moleculă *VirD2*, fiind acoperită de monomeri multipli *VirE2*. Alţi membri ai regulonului *vir* sunt lipsiţi de un rol aparent în tumorigeneză, probabil ca o consecinţă a redundanţei funcţionale.

Procesele celulare implicate în interacţiile *Agrobacterium* – celula vegetală, sumarizate în Tabelul 7.2, evidenţiază faptul că majoritatea genelor necesare în tumorigeneză sunt localizate în plasmida Ti, dar în acest proces sunt implicate şi unele gene situate pe cromozomul bacterian, cu rol în sinteza de exopolizaharide şi în procesul de ataşare a bacteriei la celula vegetală, reglarea inducerii genelor *vir* şi transportul ADN-T (*chvA, chvB, pscA, Att*,etc.).

Tabelul 7.2.

Interacţiile *Agrobacterium* – celulă gazdă (după J.Sheng şi V. Citovschi, 1996).

Procesul celular	Etapele specifice ale interacţiunii	Proteinele bacteriene implicate
Recunoaşterea intercelulară	Ataşarea bacteriei la receptorii de la suprafaţa celulei vegetale	*ChvA, ChvB, PscA, Att*
Transducţia semnalelor	Recunoaşterea moleculelor semnal vegetale şi activarea mecanismelor de transport al ADN-T	*ChvA, VirA, VirG*
Activarea transcripţională	Expresia genelor *vir* după fosforilarea activatorului transcripţional	*VirG*
Procesarea ADN-T	Mobilizarea unei copii unicatenare a ADN-T	*VirD1, VirD2, VirC1*
Transport intercelular	Formarea complexului ADN-T şi a canalului transmembranar; exportul ADN-T în citoplasma celulei gazdă	*VirE2, VirE1, VirD2, VirD4, VirB*
Importul nuclear	Interacţia cu receptorii NLS ai celulei gazda şi transpor	*VirD2, VirE2*

	tul complexului T prin porii nucleari	
Importul nuclear	Interacţia cu receptorii NLS ai celulei gazda şi transportul complexului T prin porii nucleari	*VirD2, VirE2*
Integrarea ADN-T	Integrarea în genomul celulei vegetale; sinteza celei de a 2-a catene a ADN-T	*Vir D2, Vir E2*

Cu toate că procesul generării unei catene-T are multe similitudini cu conjugarea bacteriană, etapele finale ale transferului ADN-T, pătrunderea acestuia în nucleul celulei gazda şi integrarea în genomul nuclear (Fig.3, etapa 7) au mult mai multe elemante similare infecţiei virale.

Întrucât microorganismele patogene utilizează mecanismele celulare ale gazdei pentru propriile necesităţi, şi *Agrobacterium* foloseşte unele procese celulare endogene pentru transportul complexului-T în nucleul celulei vegetale. Dimensiunea estimată a complexului-T este de 50.000 kD, depăşind cu mult dimensiunea de excluzie a porului nuclear (60 kD), ceea ce sugerează necesitatea unui transport activ, pentru realizarea căruia se impune existenţa unor semnale de localizare nucleară (NLS) care să medieze acest transfer.

NLS constau din secvenţe situate în structura proteinelor care însoţesc ADN-T şi care sunt recunoscute de mecanismele nucleare de import. Atât proteinele *VirD2* cat şi proteinele *Vir E2* conţin astfel de secvenţe NLS care au rolul de a identifica proteinele–ţintă (histone) din nucleii vegetali, pentru transferul eficient al ADN-T în nucleul celulei gazdă.

Spre deosebire de alte elemente ADN mobile, cum sunt transpozonii şi retrovirusurile, ADN-T nu codifică pentru activităţile enzimatice necesare integrării sale. Această lipsă este suplinită de componentele proteice ale complexului-T, respectiv proteinele *VirD2* şi *Vir E2,* la care se adaugă factori nucleari precum *AtKu80,* ligaze ADN vegetale, ca şi alte proteine aflate în citoplasma celulei gazdă. *AtKAP- alpha* aparţine unei familii de proteine numite importine, cunoscute ca fiind implicate în translocarea nucleară a proteinelor care conţin secvenţe NLS. Existenţa proteinei *Vip1,* identificată la *Arabidopsis,* o proteina vegetală de care depinde eficienţa infecţiei, respectiv importul nuclear al catenei-T, poate fi interpretată ca fiind rezultatul unei lungi relaţii evolutive dintre *Agrobacterium* şi planta gazdă. *Vip1* se leagă la *VirE2* şi actionează ca un adaptor molecular între aceasta şi maşinăria nucleară de import a celulei gazdă (J.R. Zupan şi Perjovschi Zambryski, 1995; A. Loyter şi colab., 2005).

Recent s-a demonstrat că înaintea integrării catena – T este convertită în forma dublu-catenară, integrarea realizându-se prin secţionări efectuate în molecula ADN dublu-catenară din genomul nuclear al gazdei de către endonucleaza I-CeuI, urmate de unirea non-homoloagă a capetelor (T.Tzfira şi V.Citovski, 2003). Integrarea este iniţiată în regiunea „border" stânga cu ajutorul proteinei *VirE2* iar

VirD2 realizează ligarea capătului din regiunea „border"dreapta la ADN-ul vegetal, completând astfel procesul de integrare.

7.1.1.1.4. Exprimarea ADN-T în celula vegetală

ADN-T poarta informaţia genetică pentru un număr de proteine, dar aceste gene au multe caracteristici tipic eucariote dacă luam în considerare promotorii şi situsurile poly(A). Astfel se explică şi faptul că genele ADN-T nu se exprimă în *Agrobacterium tumefaciens,* ci numai în celula vegetală.

Un grup de gene ale ADN-T direcţionează producerea de hormoni vegetali, responsabili de proliferarea celulelor transformate. Produşii *iaaM* şi *iaaH* determină conversia triptofanului, via indolacetamidă în auxina acid indolacetic. Produsul *ipt* condensează isopentenil pirofosfatul şi AMP, iar compusul rezultat (isopentenil-AMP) este convertit de enzimele celulei gazdă în citochinina zeatin. Fitohormonii stimulează diviziunile celulare şi determină exprimarea la situsul de infecţie a bolii neoplastice sub forma tumorilor „crown gall" (CGT). Celulele de tip CGT se caracterizează prin diviziune autonomă fiind capabile să-şi producă singure fitohormonii necesari pentru reglarea creşterii şi diviziunii celulare; ca urmare celulele CGT pot creşte „in vitro" în absenţa hormonilor exogeni.

Un al doilea set de gene ale ADN-T codifică pentru sinteza nutrienţilor bacterieni numite opine. Acestea se formează prin condensarea unui aminoacid cu un acid keto sau cu un glucid. În funcţie de tipul de opine produse în tumori, agrobacteriile se clasifică în tulpini octopinice, nopalinice, succinamopinice şi leucinopinice. Există cel puţin 20 de tipuri diferite de opine, iar fiecare tulpină de agrobacterii induce şi catabolizează un set specific de opine. De altfel, există şi 2 clase de plasmide Ti – octopinice şi nopalinice, care se disting prin structura diferită a regiunilor ADN-T. În plasmidele de tip nopalinic ADN-T constă dintr-un segment continuu de aproximativ 22 kb, în timp ce ADN-T octopinic este constituit din 3 segmente: cel stâng (TL) de 13kb, cel central (TC) de 1,5 kb şi cel drept (TR) de 7,8kb. Segmentul stâng (TL) conţine genele cu funcţii oncogene, iar cel drept genele pentru sinteza opinelor (Fig.1). Opinele reprezintă nu numai resurse nutritive pentru agrobacterii, ci acţionează şi ca semnale pentru inducerea prin conjugare a transferului plasmidelor Ti de la o bacterie donor la una receptoare.

Într-o plasmidă de tip octopinic genele *ocs* codifică pentru octopinsintaza, care condenseaza piruvatul cu arginina, lisina, histidina sau ornitina pentru a produce octopine, lisopine, histopine sau acid octopinic. Produşii genelor *mas2'* şi *mas1'* determină formarea de manopine şi de acid manopinic, iar produsul genei *ags* catalizează lactonizarea manopinelor pentru a forma agropine şi acid agropinic.

Cu toate că opinele diferă din punct de vedere structural, o tumoare produce numai anumite opine, tipul acestora fiind strict dependent de tulpina bacteriană care a realizat infecţia. Prin urmare plasmidele Ti nu numai că dictează setul de opine care sunt sintetizate în neoplasm, dar conferă şi bacteriilor de la care provin capacitatea de a utiliza acelaşi set de opine ca sursă de azot şi de carbon, întrucât preluarea şi catabolizarea opinelor se află sub controlul strict al unui număr de peste 40 de gene, situate tot pe plasmida Ti dar în afara segmentului ADN-T. Putem spune că aceste plasmide sunt de tip catabolic, ele creând o strategie unică

de parazitism la plantele superioare, prin transformarea genetică a celulelor acestora.

Prin transformarea neoplastică bacteriile îşi creează o nişa ecologică proprie, deoarece numai ele sunt capabile să beneficieze de opinele sintetizate şi secretate de celulele transformate ale plantei. Ca urmare, o bună parte a capacităţii fotosintetice a plantei gazda este exploatată de *Agrobacterium* pentru creşterea şi multiplicarea sa, printr-un mecanism eficient de transfer al propriilor gene în celulele plantei superioare, utilizând capacităţile sintetice şi energetice ale gazdei. Totodată, opinele au efect chemotactic, de stimulare a fenomenului de conjugare, astfel că prin transferul plasmidelor Ti populaţia bacteriană care utilizează opinele devine mai numeroasă. În condiţii naturale, fenomenul poate fi considerat un exemplu de co-diferenţiere a două organisme printr-un schimb mutual de semnale, stabilit pe parcursul evoluţiei, astfel că o multitudine de potenţe, atât ale celulei bacteriene cât şi ale celulei vegetale, să se desfăşoare în secvenţe spaţiale şi temporale exacte (A. Rosu, 1999).

Tulpinile de *Agrobacterium* sunt în general clasificate în 4 biotipuri, în funcţie de caracteristicile creşterii şi metabolismului: *A. tumefaciens, A. rhizogenes, A. rubi* şi *A. vitis*. Este de remarcat faptul că în absenţa plasmidelor Ti aceste biotipuri îşi pierd virulenţa şi devin nepatogene. Mai mult decât atât, *A.tumefaciens* poate fi „convertită" în *A. rhizogenes* şi invers, prin substituirea tipului de plasmidă oncogenă de la o tulpină la alta.

Un alt aspect important este cel referitor la gama speciilor gazdă pentru diferitele tulpini de agrobacterii. Ca gen, *Agrobacterium* poate transfera ADN la numeroase organisme vegetale dintre angiospermele di- şi monocotiledonate şi dintre gimnosperme. În plus *Agrobacterium* poate transforma fungi (drojdii, ascomicete şi basidiomicete), iar recent s-a raportat şi transfer de ADN în celule umane (S.B. Gelvin, 2003). Se pare că genele plasmidei Ti mai curând decât genele cromosomale au rol determinant în definirea spectrului de specii gazdă. Astfel genele *virC* si *virF* determină gama de specii care pot fi transformate prin inducerea de tumori „crown gall", în timp ce genei *VirH* (numită anterior *pinF*) i se datorează capacitatea unor tulpini de a transforma porumbul.

Cu toate acestea trebuie să admitem că determinarea spectrului de specii gazdă este un proces mult mai complex, aflat sub controlul unor factori multipli, atât din partea bacteriei cât şi a plantei gazdă.

7.1.1.1.5. Transformarea genetică indusă de *Agrobacterium rhizogenes*

Cu mulţi ani înainte de elucidarea mecanismelor moleculare ale transformării plantelor mediate de *Agrobacterium,* Armin Braun (1947) a propus ipoteza că infecţia cu *Agrobacterium tumefaciens* este corelată cu transferul unui „principiu" de la bacterie la celulele plantei gazdă, care induce transformarea stabilă a acestora în celule de tip tumoral. În 1977, M.D. Chilton a demonstrat că formarea tumorilor (CGT) este fără îndoială rezultatul transferului genelor din regiunea T a plasmidelor bacteriene în genomul nuclear al celulelor plantei.

Ulterior, s-a constatat ca *Agrobacterium tumefaciens* nu este singurul microorganism capabil în condiţii naturale să transforme genetic o celulă vegetală. *Agrobacterium rhizogenes* provoacă de asemenea o boală neoplastică la plante, cunoscută sub numele de „boala rădăcinilor firoase" (hairy roots), întrucât se caracterizează prin proliferarea de rădăcini adventive la situsul de infecţie. Bazele moleculare ale acestei infecţii sunt foarte asemănătoare cu cele descrise în cazul tumorigenezei de tip „crown gall".

Ca şi în cazul celulelor de tip CGT şi acest tip de neoplasm se caracterizează prin:

- modificarea stabilă a modului de creştere prin independenţa faţă de hormonii exogeni;
- sinteza de metaboliţi noi, cu greutate moleculară mică, de tipul opinelor, care servesc drept nutrienţi specifici pentru tulpinile oncogene de *A. rhizogenes*.

Virulenţa bacteriei este asociată tot cu prezenţa unei plasmide mari – plasmida Ri („root inducing"). Regiunea T a plasmidei, flancată în partea dreaptă şi în cea stângă de secvenţele „border" de 25 bp, este transferată în celulele plantei iar exprimarea genelor aparţinând segmentului ADN-T determină fenotipul neoplastic al celulelor gazdă. Deosebirile între cele două boli neoplastice vizează structura segmentelor ADN-T, efectul genelor din segmentul T asupra metabolismului hormonal şi implicit asupra morfologiei neoplasmului şi a tipurilor de opine produse.

ADN-T al plasmidei Ri este divizat în două părti, dreapta şi stânga (TR cuprinde între 8 si 20 kb şi TL – între 15 şi 20 kb). Genele situate în segmentul ADN-TR codifică pentru sinteza de auxine şi de opine de către celulele vegetale transformate, şi au multe caracteristici eucariote, ceea ce explică faptul că aceste gene nu se exprimă în celula bacteriană care produce infecţia, ci numai în celula gazdă. Opinele sintetizate de celulele vegetale ca urmare a transferului în genomul lor nuclear al ADN-T al plasmidei Ri includ agropine, acid agropinic, manopine, acid manopinic, agrocinipine şi cucumopine.

În segmentul ADN-TR au fost identificate 2 gene responsabile pentru sinteza de auxine, *aux1* şi *aux2*, acţiunea lor desfăşurându-se în două etape: mai întâi are loc decarboxilarea triptofanului, ceea ce conduce la formarea de indol-3-acetamida (IAM), care în etapa următoare este convertită în acid indole-3-acetic (IAA).

În segmentul ADN-TL al plasmidelor Ri de tip agropinic au fost descrişi 4 loci numiţi *„rol"*(root locus)- A,B,C şi D, asociaţi cu apariţia şi menţinerea fenotipului „hairy roots" în diferite sisteme experimentale. Cu toate că rolul exact al acestor gene nu a fost elucidat pe deplin, se pare că *rolB* determină potenţialul morfogenetic (rizogen) al celulelor vegetale transformate. Proteina *ROL-B* este o beta-glucosidază, iar acţiunea sa constă fie în eliberarea auxinelor active din conjugati inactivi, conducând astfel la o creştere a concentraţiei intracelulare de acid indole-3-acetic, fie în stimularea reactivităţii celulelor chiar şi la concentraţii reduse de auxine.

Mecanismele mobilizării ADN-T şi al transferului acestuia în celulele vegetale sunt în esenţă similare cu cele descrise în cazul plasmidei Ti. Este însă de remarcat faptul că la unele tulpini de *A. rhizogenes* lipsesc genele *virE1* şi *virE2* din plasmida Ri. S-a demonstrat recent că în absenţa proteinelor specificate de aceste două gene, care sunt critice pentru virulenţă, respectiv pentru transferul catenei – T în celula gazdă, plasmida Ri codifică pentru proteina *GALLS* care preia rolul proteinelor *VirE1* şi *Vir E2* astfel încât transferul ADN-T se realizează eficient (K. Lemacke şi colab., 2000; L.D. Hodges şi colab, 2004).

Cu toate că, în general, consecinţele fenotipice ale infecţiei produse de *Agrobacterium rhizogenes* constau din inducerea dezvoltării de rădăcini, în unele cazuri se dezvoltă şi lăstari la situsul de infecţie. S-a demonstrat că *rolB* este o genă inductoare de meristeme iar expresia sa, combinată şi cu a celorlalte gene *rol*, conduce la apariţia aşa-numitului sindrom „hairy roots", constând dintr-un ansamblu de modificări morfologice la plantele transformate. Se apreciază că locusul *rolA* este asociat cu scurtarea internodurilor şi cutarea frunzelor, locusul *rolB* cu dezvoltarea unui sistem radicular amplu şi cu anomalii la nivelul organelor florale iar locusul *rolC* cu reducerea dominanţei apicale.

În afara genelor *rol* şi alte gene ale ADN-T din plasmida Ri, cum este gena *orf13* produc modificări severe ale morfologiei şi ale tipului de creştere. Se presupune că ORF13 interferează în procesul de diferenţiere celulară şi conferă competenţă meristematică celulelor infectate (P.A. Stieger şi colab., 2004).

Cooperarea dintre genele implicate în sinteza opinelor, exprimate funcţional numai în celulele vegetale trasformate, şi genele celulei bacteriene care controlează catabolizarea opinelor, situate pe plasmida Ti sau Ri, constituie elementul central al conceptului de „colonizare genetică". Este remarcabilă capacitatea tulpinilor virulente de *A. tumefaciens* şi *A. rhizogenes* de a-şi dezvolta o strategie unică de parazitism la plantele superioare, prin transformare genetică naturală a celulelor acestora. *Agrobacterium* nu este un microorganism patogen tipic, ci un manipulator sofisticat al mediului în care trăieşte, iar mecanismele de care dispune pentru a realiza transferul de informaţie genetică inter-regnuri a revoluţionat biotehnologia, prin faptul că a servit ca model pentru transformarea genetică experimentală a speciilor de plante de interes economic (L. Valentine, 2003).

O comunicare recentă menţionează posibilitatea transferului de gene şi prin intermediul altor tipuri de bacterii, care nu aparţin genului *Agrobacterium* (W.Broothaerts şi colab., 2005). Specii de bacterii non-virulente aparţinând genurilor *Rhizobium, Sinorhizobium* şi *Mesorhizobium* în care s-au introdus plasmide Ti au realizat transformarea atât la specii de plante dicotiledonate cât si monocotiledonate. Chiar dacă eficienţa transformării a fost mult mai scazută decât cea mediată de *Agrobacterium,* aceasta a fost însă suficientă pentru a atrage atenţia cercetătorilor interesaţi în transgeneză. Cu toate că în transformarea realizată de *Agrobacterium* majoritatea factorilor responsabili se află pe plasmida Ti, există şi alte elemente implicate, situate pe cromozomul bacterian, care probabil că au

echivalenţi sau omologi şi la specii non-virulente de *Rhizobium*, plasmida Ti fiind suficientă pentru a le conferi acestora competenţă pentru transferul genic.

7.1.1.1.6. Manipularea genomului vegetal mediată de *Agrobacterium*

Sistemul de transformare realizat de plasmidele de la *Agrobacterium* suscită în permananţă interesul specialiştilor, întrucât reprezintă un exemplu de inginerie genetică realizat pe cale naturală. Elucidarea modului în care ADN-T pătrunde în mod natural şi se integrează în ADN din celulele plantelor a condus la ideea utilizării plasmidelor Ti şi Ri pentru a transporta gene străine în celulele ce urmează a fi transformate.

Caracteristica esenţială care recomandă utilizarea speciilor de *Agrobacterium* pentru transformarea dirijată a plantelor constă în faptul că transferul segmentului ADN-T este condiţionat numai de existenţa secvenţelor „border" şi nu de genele propriu zise care se află pe acest segment.

Transformarea stabilă a plantelor depinde de câţiva factori, cei mai importanţi fiind specia de plantă care urmează a fi transformată şi protocolul utilizat. Plasmida Ti a bacteriei *Agrobacterium tumefaciens* reprezintă vectorul cel mai mult utilizat pentru transformarea a numeroase specii dicotiledonate şi chiar dintre monocotiledonate, cu toate că acestea nu sunt în general susceptibile la infecţia cu *Agrobacterium.* Genele bacteriene naturale aflate pe segmentul ADN-T, responsabile de proprietăţile oncogene ale bacteriei, nu sunt de dorit în plantele transgenice şi ele pot fi înlăturate în totalitate fără sa fie afectată capacitatea de transformare, menţinându-se numai secvenţele „border"şi în acest caz vectorul se numeşte „dezarmat". Între cele două secvenţe „border" sunt inserate diferite transgene însoţite de elementele lor de control (promotori, gene marker de selecţie, gene raportoare, etc).

Plasmida Ti de tip sălbatic este de dimensiuni mari (200kb) şi în consecinţă este dificil de manipulat în experimentele de transfer genic. Aceste dificultăţi au fost depăşite ca urmare a constatării că ADN-T şi regiunea *vir* pot fi separate în două plasmide diferite, fără ca ADN-T să îşi piardă capacitatea de transfer. Au fost astfel construiţi vectorii binari care constau din doua plasmide: o plasmidă dezarmată care conţine genele *vir* şi o plasmidă mai mică, în care se află ADN-T. Miniplasmidele Ti se obţin prin inserarea segmentului Ti într-un vector clasic de *E. coli.* Segmentul de ADN-T construit artificial cu diferite transgene, este prevăzut, pe lângă secvenţele „border" şi cu o origine specială a replicării compatibilă cu plasmida Ti în *Agrobacterium*, care permite replicarea atât în *E. coli* cât şi în *Agrobacterium tumefaciens.* În consecinţă, atunci când acest vector binar este introdus în *Agrobacterium*, genele *vir* ale plasmidei dezarmate vor acţiona *in trans* pentru a transfera ADN-T recombinant din vectorul binar în celula vegetală.

În unele cazuri se utilizează o plasmidă intermediară de talie mică în care se introduc transgenele, dar acest vector nu se poate replica în *Agrobacterium,* ci se integrează prin recombinare într-o plasmida Ti dezarmată, rezultând un vector de tip cointegrat.

7.1.1.2. Componentele transgenelor

Promotorii, constitutivi sau inductibili, sunt aleşi în funcţie de scopul procesului de transformare întrucât facilitează controlul expresiei transgenelor. Dacă o plantă transgenică este generată în scopul producerii în cantităţi mari şi în toate ţesuturile a unui anumit compus, promotorii constitutivi larg utilizaţi sunt de origine virală. Promotorul 35S care provine de la virusul mozaicului conopidei determină niveluri ridicate ale transcripţiei în majoritatea ţesuturilor vegetale, dar în unele cazuri a generat efecte negative precum silenţierea genică prin cosupresie. Acest fenomen este mai puţin întâlnit atunci când se folosesc promotori constitutivi de origine vegetală, ca promotorii ubiquitin şi actin. O altă opţiune poate viza utilizarea unor promotori pentru direcţionarea expresiei transgenelor spre organe specifice (frunze, tuberculi sau fructe), bogate în precursori importanţi pentru ingineria metabolică. Această opţiune prezintă avantajul că reduce impactul expresiei transgenelor asupra creşterii şi dezvoltării normale a plantei dar în acelaşi timp permite producerea compuşilor de interes în ţesuturi care pot fi uşor colectate pentru extracţii. Pentru controlul nivelului expresiei genice în ingineria metabolică se utilizează mai curând promotori caracterizaţi prin capacităţi reglatoare mai subtile şi nu promotori care reglează producerea unui compus specific în cantităţi foarte ridicate.

Din categoria promotorilor inductibili se evidentiază promotorul responsiv la pristinamicina, un antibiotic poliketidic ce nu se întâlneşte în mod normal în celulele vegetale. În cazul în care culturile celulare sunt transformate, prezenţa acestui promotor determină expresia transgenelor pentru antibioticul respectiv şi astfel este controlată contaminarea bacteriană, aspect foarte important în cazul culturilor celuluare din bioreactoare.

Semnalele de poliadenilare sau de încheiere a transcripţiei derivă de la gena nopalin-sintazei de la *Agrobacterium tumefaciens,* şi au fost utilizate cu succes la o gama larga de specii, dicotiledonate şi monocotiledonate. Astfel de semnale *poly(A)* cu eficacitate semnificativă au fost identificate şi la plante, cum sunt de pilda regiunile 3' necodificatoare ale genei *Mel*a sistemului fotosintetic sau gena pentru histona H3 de la grâu.

Intronii incorporaţi în transgene au efecte de stimulare a expresiei genice prin mecanisme încă neelucidate. Cu toate că în mod normal intronii nu mai sunt reprezentaţi în mesajele eucariote datorită procesării ARN-m în nucleu, se pare ca tocmai această procesare stimulează translocarea eficientă a ARN în citosol, unde se realizează traducerea. O serie de introni vegetali sunt utilizaţi pentru stimularea expresiei transgenelor, cum sunt: intronul 1 al genei pentru actina de la orez, intronul 1 al genei pentru ubiquitina de la porumb, intronul 1 al genei pentru sucrose-sintaza şi intronul 1 al genei pentru alcool-dehidrogenaza de la porumb.

Compoziţia nucleotidică a regiunii traduse sub raportul codonilor existenţi şi al conţinutului în G+C pentru a corespunde corect complementului ARN-t al noii gazde cotribuie la creşterea substanţiala a expresiei transgenelor, având în vedere că acestea provin şi de la specii foarte diferite, cum sunt bacteriile şi fungi.

Semnalele pentru organitele ţintă au rolul de a direcţiona proteinele recombinante spre anumite organite celulare, conform scopului practic urmărit, aspect foarte important în ingineria metabolică. De exemplu, poate fi direcţionat factorul de transcriere în nucleu, iar proteinele implicate în sinteza carbohidraţilor şi a poliesterilor în plastide. Au fost identificate secvenţe specifice de aminoacizi care servesc la direcţionarea proteinelor spre organite specifice precum reticulul endoplasmatic, membranele celulare, plastide, microcorpi, etc. şi menţinerea proteinelor la nivelul acestor organite. De exemplu adiţia primilor 23 de aminoacizi ai subunităţii mici a proteinei *Rubisco* de la mazăre la capatul N al proteinei recombinante are ca efect direcţionarea acestei proteine spre plastide, iar adiţia ultimilor 5-34 de aminoacizi ai isocitrat-liazei vegetale la capatul C al proteinei recombinante conduce la direcţionarea acesteia spre microcorpi. Întrucât plastidele şi mitocondriile conţin propriul material genetic, alte abordări vizează transformarea directă a acestor organite, care, datorită relaţiilor evolutive cu bacteriile, oferă avantajul introducerii genelor prin recombinare omoloagă, absenţei silenţierii şi capacităţii de exprimare a genelor policistronice. Până în prezent s-a realizat cu succes transformarea plastidelor atât prin introducerea unor gene care controlează caractere de interes agronomic dar şi gene care codifică pentru proteine implicate în sinteza de biopolimeri (P.A. Lessard, 2002).

7.1.1.3. Genele marker şi genele raportoare

După realizarea infecţiei este necesară monitorizarea stării transformate, deoarece nu toate celulele unui ţesut sau organ vor fi transformate. De regulă se obţin structuri himerale care impun utilizarea unor sisteme de selecţie a celulelor transformate, urmate de regenerarea de plante transformate în totalitate şi stabil. Pentru aceasta transgenele inserate în ADN-T sunt însoţite de gene marker sau de gene raportoare.

Între markerii de selecţie cel mai des utilizate sunt genele care conferă celulelor transformate rezistenţă la antibiotice de tipul kanamicinei şi higromicinei, streptomicinei, gentamicinei şi cloramfenicolului. Selecţia liniilor celulare transformate de la care sunt regenerate plantele transgenice se realizează prin introducerea în mediul de cultură a acestor antibiotice, care previn creşterea celulară în absenţa genelor de rezistenţă. Kanamicina şi higromicina sunt inhibitori ai funcţiei ribosomale iar enzimele care conferă bacteriilor rezistenţă la aceşti compuşi (ca neomicin fosfotransferaza-NPT II şi higromicin fosfotransferaza), vor transfera rezistenţa la antibiotice şi celulelor vegetale transformate. Majoritatea acestor markeri operează prin modificarea chimică a antibioticului ca urmare a unor procese de fosforilare sau de acetilare, rezultatul fiind inactivarea acestora, astfel că celulele transformate pot creşte şi diferenţia pe mediile de cultură care conţin antibioticele respective.

O altă strategie de selecţie a celulelor vegetale transgenice utilizează markeri pentru rezistenţa la erbicide. Erbicidele utilizate în aceste scopuri acţionează prin inhibarea unor procese de tipul sintezei acizilor amino aromatici, care sunt critice pentru celulele vegetale autotrofe. Strategia de inducere a

rezistenței la erbicide se bazează pe activitatea enzimelor care modifică sau metabolizează compusul cu efect erbicid.

În general, inducerea rezistenței la antibiotice și la erbicide este definită ca strategie de selecție negativă, deoarece agenții de selecție utilizați omoară celulele netransformate. În plus, utilizarea markerilor de rezistență a condus la îngrijorarea justificată a publicului privind posibilitatea transferului genelor marker de rezistență la alte specii decât cele țintă, cum sunt buruienile sau microbii. Pentru alevierea acestor probleme s-a propus elaborarea de metode pentru eliminarea markerilor de selecție după ce transformarea a fost rezolvată. Una dintre abordările experimentale recomandă „cotransformarea" simultană dar independentă cu o genă marker a unei molecule de ADN, și cu gena de interes a altei molecule separate de ADN din cromozomii vegetali. Cu o oarecare frecvență aceste gene se vor integra în ADN cromozomal al celulei vegetale la loci diferiți, și este posibilă înlăturarea markerilor de selecție din plantele transgenice prin procesul normal de segregare cromozomală. În practică, acest procedeu s-a dovedit însă a fi deosebit de laborios și în consecință au fost elaborate recent noi metode, încadrate în conceptul de strategie de selecție pozitivă, care exclud utilizarea unor markeri de tipul genelor pentru rezistența la antibiotice sau la erbicide. În acest context se înscrie utilizarea transgenelor care permit celulelor transformate să utilizeze noi surse de carbon sau care codifică enzime implicate în biosinteza de hormoni.

Spre deosebire de țesuturile verzi fotosintetice care pot fixa carbonul din aer, pentru celulele vegetale cultivate „in vitro" sursa de carbon trebuie să fie suplinită exogen, de regulă sub formă de sucroză introdusă în mediul de cultură. Celulele plantelor nu pot să asimileze sursele de carbon utilizate de bacterii sau de drojdii, de tipul xilozei sau manozei. Introducerea unor markeri de selecție codificatori pentru enzime care convertesc surse de carbon neutilizabile în glucide ce pot fi recunoscute și utilizate de către celulele vegetale transformate s-a concretizat deja în selectarea de plante transgenice regenerate pe medii de cultură având xiloza sau manoza ca surse de carbon.

Alte abordări ale problemei markerilor de selecție pozitivă vizează biosinteza citochininelor, hormoni care stimulează diviziunile celulare și care sunt implicați în multe procese morfogenetice, în special în dezvoltarea de lăstari adventivi în culturi „in vitro". Biosinteza de citochinine poate fi stimulată în celulele transformate prin introducerea unei gene care codifică pentru isopentenil transferaza, o enzimă cheie a biosintezei acestor hormoni, iar regenerarea de plante de la celulele transformate cu această enzimă a permis selecția acestora fără să mai fie nevoie de alți markeri (P.A. Lessard și colab., 2002).

Genele raportoare oferă certe avantaje față de markerii de rezistență în monitorizarea stării transformate, întrucât ele codifică proteine care pot fi detectate direct sau care catalizează reacții specifice ai căror produși pot fi detectați prin metode relativ simple. Frecvent utilizate sunt genele care codifică pentru enzime ca *GUS* (Beta-glucuronidaza) și *CAT* (Cloramfenicol acetiltransferaza), implicate în catalizarea unor reacții chimice la nivelul unor substrate enzimatice specifice, cuplate cu colorarea țesuturilor transformate. Tot din categoria genelor raportoare

fac parte gena *luc* care codifică pentru enzima luciferaza ce produce bioluminiscența si gena *gfp* care codifică pentru o proteină cu fluorescență verde (*GFP*), reprezintand cea mai nouă genă raportoare şi totodată cea mai spectaculoasă şi avantajoasă. Exprimarea genei *gfp* nu influenţează negativ creşterea şi fiziologia plantei, iar printr-o simplă iradiere cu lumină albastră sau cu UV, fără să fie nevoie de substraturi scumpe, proteina *GFP* devine fluorescentă, fapt ce constituie un indicator eficient al stării de transformare. Din păcate, proteina fluorescentă nu permite şi monitorizarea nivelului expresiei genice, întrucât nu dispunem încă de metode de cuantificare a fluorescenţei. Cuantificarea nivelurilor expresiei genice se poate însă realiza în cazul utilizării genelor raportoare pentru luciferază, în cazul cărora dispunem de tehnologia care permite monitorizarea expresiei unor gene multiple prin detectarea bioluminiscenţei (R. Ogura şi colab., 2005).

Din categoria markerilor moleculari analiza lungimii fragmentelor de restricţie (RFL) oferă dovada prezenţei ADN-T în genomul vegetal permiţând astfel monitorizarea stării transformate fără ca fiziologia şi creşterea organismului vegetal să fie perturbate.

7.1.1.4. Silenţierea transgenelor şi expresia tranzitorie

Termenul de expresie tranzitorie este atribuit pentru ADN-ul care este transferat în celula receptoare, dar este transcris şi tradus în citoplasmă, fără ca de fapt să fie încorporat în genomul celulei. Acest ADN va fi „diluat" pe parcursul ciclurilor celulare, astfel că expresia sa va dispărea în timp, de unde şi termenul de expresie tranzitorie. În unele cazuri o anumită transgenă şi respectiv produs transgenic sunt utile numai în etapa iniţială a transformării, dar nu se mai doreşte prezenţa lor după ce transformarea s-a realizat. Pentru aceasta se folosesc sisteme ADN „nonintegrative", bazate pe mutante de *Agrobacterium* care realizează eficient transferul nuclear al ADN-T dar care sunt deficiente în ce priveşte integrarea ADN-T în genomul celulelor plantei şi ca urmare genele transferate se pot exprima tranzitoriu dar nu se pot integra eficient.

Incidenţa fenomenului de silenţiere trebuie de asemenea luată în considerare în experimentele de transformare genetică. La plante, ca şi la alte eucariote se petrec două tipuri de silenţiere: transcripţională (TGS) şi post transcripţională (PTGS).

TGS constă în metilarea promotorilor şi a secvenţelor codificatoare ale genelor, ceea ce are drept rezultat blocarea transcripţiei. PTGS se realizează prin degradarea direcţionată, cu specificitate secvenţiala a anumitor ARNm.

Silenţierea exprimării transgenelor la plante a fost mai întâi observată în urmă cu 15 ani, pe baza constatărilor că în urma transformării efectuate la Petunia cu extracopii ale genei chalcone-sintaza, are loc o blocare atât a expresiei transgenei cât şi a genei endogene corespunzătoare, şi acest fenomen a primit numele de cosupresie (C. Napoli, 1990). Ulterior s-a constatat că fenomenul de cosupresie are similitudini cu alte metode de blocare a expresiei genice, ca de exemplu cu tehnologia ARN antisens, în care expresia unei versiuni antisens a unei

gene blochează expresia versiunii normale a genei respective, şi cu tehnologia ARNi, prin care injectarea unui ARN dublucatenar blochează expresia unei gene.

Silenţierea nu este de dorit întrucât nu este în totalitate previzibilă şi creează probleme în ingineria metabolică la plante deoarece vizează atât genele străine, cât şi extracopiile genelor endogene, fiind mai frecventă în condiţiile existenţei unui număr crescut de copii ale transgenelor. Pentru prevenirea silenţierii se aleg metode de transformare (cum este cea mediată de *Agrobacterium*), prin care are loc integrarea în genom a unui număr redus de copii ale transgenei, de dorit fiind inserţia de copii unice ale ADN-T. Se utilizează şi alte metode de ameliorare a silenţierii transgenice, ca de exemplu flancarea transgenelor în cadrul ADN-T cu regiuni de ataşare la „matricea" cromozomală (MARs), cu rol în insularea genelor şi protejarea lor de efectele de silenţiere ale domeniilor vecine, sau se apelează la supresori virali ai silenţierii genelor.

Trebuie menţionat însă că silenţierile de tip TGS şi PTGS au şi efecte pozitive în domeniul ingineriei metabolice, când se doreşte blocarea expresiei uneia sau mai multor gene endogene. Odată cu perfecţionarea tehnicilor de inginerie genetică specialiştii au posibilitatea să recurgă la promotori capabili să regleze expresia unor transgene într-un anumit ţesut, într-o anumită etapă a dezvoltării sau în anumite condiţii de mediu. Poate fi astfel modulată expresia transgenelor după dorinţă, realizând fie hiperexpresia unui anumit produs, fie limitarea expresiei unor produse care pot fi toxice în timpul unor anumite stadii ale dezvoltării plantei. (P.A. Lessard şi colab., 2002; S.B. Gelvin, 2003).

7.1.2. Metode fizice de transfer genic

Progresele înregistrate în domeniul biotehnologiei agricole moderne se datorează într-o mare măsură utilizării bacteriilor aparţinând genului *Agrobacterium* în transgeneză, prin exploatarea abilităţii pe care aceste bacterii şi-au dezvoltat-o pe parcursul a milioane de ani de a transforma genetic numerose organisme. Cu toate acestea tehnologia se confruntă cu unele limite a căror depăşire constituie obiectivul permanent al eforturilor concertate ale specialiştilor.

În primul rând rămâne o provocare pentru specialişti extinderea gamei de specii gazdă şi creşterea eficienţei transformării, întrucât multe specii de importanţă agronomică şi linii ameliorate rămân recalcitrante la transformarea genetică mediată de *Agrobacterium.*

Aplicate mai întâi la Gramineae, unde utilizarea sistemului *Agrobacterium* se confruntă cu dificultăţi care au început să fie surmontate abia în ultimii ani, tehnicile transferului direct de gene şi-au demonstrat eficienţa în cazul multor specii de plante.

Electroporarea se bazează pe supunerea celulelor sau a protoplaştilor la pulsuri de înalt voltaj pentru a induce temporar pori la nivelul membranelor, prin care pot pătrunde diferite macromolecule, inclusiv ADN. Porii creaţi în pereţii celulari şi în sistemul membranar prin administrarea de impulsuri electrice intense dar de durată foarte scurtă permit materialului genetic străin să pătrundă uşor în

mediul celular, fără să mai fie necesară etapa laborioasă a construirii plasmidelor vector. Avantajul aplicării acestei metode constă în faptul că gama speciilor gazdă nu este limitată şi nu mai este necesară utilizarea unor concentraţii ridicate de antibiotice pentru a elimina bacteriile din ţesuturile transformate.

Transformarea prin intermediul **microinjectării** directe de ADN în nucleii unor celule embriogenice izolate a condus la obţinerea unor transformanţi stabili la câteva specii mono şi dicotiledonare.Tehnica impune însă utilizarea unui echipament tehnic relativ costisitor pentru micromanipularea celulelor izolate în vederea injectării unei cantităţi foarte mici de ADN. Regenerarea de plante de la celulele supuse microinjectării constituie o condiţie esenţială pentru demonstrarea eficienţei acestei metode de transfer genic.

Metoda biolistică de transformare nu este limitată de specie sau de tipul de ţesut şi se bazează pe bombardarea celulelor sau a ţesuturilor cu microproiectile pe suprafaţa cărora se află materialul genetic destinat transformării. Particulele sunt de regulă de aur sau de tungsten, de 4 microni în diametru, iar viteza accelerată este de 250 m/s, suficientă pentru ca particulele invelite în ADN-ul străin să penetreze pereţii celulari şi membranele. Aplicată cu succes la specii monocotiledonate, metoda prezintă avantajul că pe lângă transformarea genomului nuclear se poate realiza introducerea de gene străine şi în cloroplaste. Deoarece genomul plastidial este adesea duplicat de mai multe ori în cadrul aceleiaşi plastide, iar plastidele sunt prezente într-un număr ridicat în multe tipuri celulare, transformarea plastidelor conduce la o amplificare genică substanţială. Totodată, plastidele sunt moştenite pe linie maternă, nu sunt prezente în polen şi ca urmare se poate realiza mai uşor controlul dispersiei transgenelor de la plantele transformate în mediul înconjurător.

Transformarea biolistică este procedeul utilizat cel mai frecvent pentru transformarea tranzitorie a ţesuturilor. Ca şi în cazul electroporării, un dezavantaj constă în faptul că se produc inserţii multiple ale transgenelor, ceea ce poate avea ca rezultat instabilitatea şi silenţierea acestora.

Toate metodele de transformare descrise îşi demonstrează utilitatea practică doar în masura în care se dispune de procedee eficiente de regenerare „in vitro" de plante de la celulele sau ţesuturile transformate. Chiar şi în cazul monocotiledonatelor, de multe ori succesul transformării este limitat nu atât de eficienţa transferului şi integrării ADN în genomul plantei, ci de rata scăzută a capacităţii morfogenetice şi implicit a regenerării de plante de la ţesuturile supuse transformării. Metoda transformării liniilor germinale („flower dip") permite depăşirea în unele cazuri a acestor limite, asa cum s-a demonstrat la *Arabidopsis thaliana* şi la alte specii strâns înrudite cu aceasta. Metoda constă în imersarea florilor într-o soluţie în care se află *Agrobacterium*, astfel că se produc direct seminţe transgenice, fără să mai fie nevoie un sistem de regenerare in vitro (P.A. Lessard şi colab., 2002).

7.2. TEHNICI TRANSGENICE PENTRU PRODUCEREA DE COMPUŞI FITOCHIMICI CU UTILIZĂRI TERAPEUTICE ŞI INDUSTRIALE

Plantele sintetizează o mare varietate de compuşi naturali, mulţi dintre aceştia având o considerabilă semnificaţie biologică şi industrială. Din păcate, distrugerea habitatelor naturale şi dificultăţile tehnice întâmpinate în cultivarea speciilor din flora spontană determină fluctuaţii în asigurarea cantităţilor de biomasă vegetală solicitată ca materie primă în diferite ramuri industriale, cu predilecţie în industria farmaceutică. De exemplu se estimează că cererea tot mai ridicată de paclitaxel, un compus cu pronunţat efect anicancerigen, poate conduce la reducerea îngrijorătoare a exemplarelor de *Taxus brevifolia,* în condiţiile în care arborii au creştere înceată iar conţinutul în paclitaxel al scoarţei este destul de redus (40-100 mg/kg scoarţă). Dezvoltarea tehnicilor de culturi de celule şi de ţesuturi şi ingineria metabolică contituie alternative promiţătoare pentru producerea de compuşi fitochimici utili în condiţii controlate, în flux continuu, independent de condiţiile climatice şi liberi de contaminanţi microbieni. Cultivarea celulelor sau a structurilor organizate în bioreactoare asigură, prin manipularea condiţiilor de creştere şi prin intervenţii la nivel molecular, producerea stabilă şi la niveluri ridicate a metaboliţilor doriţi.

Cercetările au evidenţiat însă faptul că, exceptând unele cazuri, acumularea de metaboliţi secundari în culturile celulare este destul de scazută, depinzând de anumite procese biochimice şi diferenţieri morfologice. Observaţiile efectuate după 1980 asupra culturilor celulare ale unor *Solanaceae*, care nu produc decât urme slabe de alcaloizi tropanici, dar că aceste sinteze cresc semnificativ după regenerarea de rădăcini de la celulele nediferenţiate, au condus la concluzia că şi în cazul culturilor de ţesuturi şi de celule de la unele specii biosinteza metaboliţilor specifici este corelată cu un anumit nivel al diferenţierii celulare şi tisulare. În consecinţă, limitele întâmpinate până nu demult, constând în principal din cantităţile reduse de compuşi secundari produse în culturile de celule nediferenţiate sunt tot mai mult depăşite datorită noilor tehnologii de inginerie genetică, mai ales prin posibilitatea inducerii diferenţierii tisulare şi organogene de tipul rădăcinilor „hairy".

7.2.1. Culturile de rădăcini ca model experimental

Rădăcinile plantelor constituie o frontieră biologică fascinantă şi neexplorată în cea mai mare parte. Metodele moderne de analiză genetică a dezvoltării şi funcţiei sistemului radicular, împreună cu o serie de metode şi instrumente de analiză a creşterii şi arhitecturii acestuia au condus la reconsiderarea rolului rădăcinilor în viaţa plantei şi în biosferă. S-a constatat că în

toate ecosistemele studiate suprafaţa ocupată de sistemul radicular o depăşeste cu mult pe cea a organelor aeriene, iar în plus rădăcinile posedă o serie de capacităţi biochimice care adesea nu au corespondenţe în organele aeriene. Toate aceste constatări au condus la recunoaşterea rădăcinilor plantelor ca fiind componente esenţiale ale productivităţii şi stabilităţii ecosistemelor, fiind capabile să sintetizeze o diversitate remarcabilă de metaboliţi secundari şi să-şi adapteze activităţile metabolice ca răspuns la factorii abiotici şi biotici de stres (H.E. Flores şi colab., 1999).

Pe lângă faptul ca rădăcinile unor specii de plante legumicole constituie partea comestibilă a acestora şi sunt utilizate de secole în alimentaţia oamenilor, diversitatea proceselor biochimice care se desfăşoară la nivelul rădăcinilor a condus şi la utilizarea acestora în scopuri medicinale (Figura 7.5). De exemplu, utilizarea din cele mai vechi timpuri în scopuri medicinale a unor specii de *Solanaceae* are o bază chimică certă, constând din alcaloizii tropanici de tipul hiosciaminei şi scopolaminei, derivaţi de la fenilalanină, ornitină sau arginină, şi care sunt sintetizaţi aproape exclusiv în rădăcini la *Hyosciamus, Duboisia, Atropa* şi *Scopolia.* Modul de acţiune al alcaloizilor tropanici se bazează pe legarea la receptorii acetilcolinici şi datorită acţiunii lor antagoniste pentru acetilcolină se utilizează în medicină ca parasimpatolitici şi relaxanţi ai musculaturii netede.

Pe lângă alcaloizii caracteristici speciilor Solanaceae, o serie de alţi compuşi importanţi sunt prezenţi în rădăcini, ca de exemplu poliacetilenele derivate de la acizii graşi (tiarubrinele şi tertienilul), considerate ca exemple tipice de nematocide, aflate în rădăcinile de galbenele (*Calendula officinalis)* şi ale altor *Asteraceae.* Peste 800 de compuşi cu activitate fototoxică, antifungică şi antibacteriană au fost caracterizaţi la speciile aparţinând acestei familii.

Sikoninele sunt un grup de naftochinone prezente în rădăcinile plantelor din familia *Boraginaceae,* care de asemenea manifestă activităţi antimicrobiene recunoscute. Emetina este un alcaloid extras din rădăcinile unei specii din America de Sud, *Cephaelis ipecacuanha,* acest compus fiind în prezent inclus în farmacopeea vestică pentru însuşirile sale de vomitiv în caz de otrăviri.

Isoflavonoidul rotenona este prezent în rădăcinile câtorva leguminoase (*Derris, Lonchocarpus)* şi este utilizat ca pesticid. Ginkgolidele sunt diterpene cunoscute ca reprezentând principiile active majore ale extractelor de rădăcini şi de frunze de la *Ginkgo biloba,* utilizate pentru tratarea bolilor coronariene, a senilităţii şi a demenţei.

Diterpenoidul labdanic forskolin, extras din rădăcinile de *Coleus forskolii* este un potenţial activator al adenilat-ciclazei, utilizată pentru tratarea astmului bronhic, în timp ce alcaloidul camptotecin, extras din rădăcinile speciei chinezeşti *Camptotheca acuminata* este unul dintre cele mai recente medicamente anticanceroase de origine vegetală.

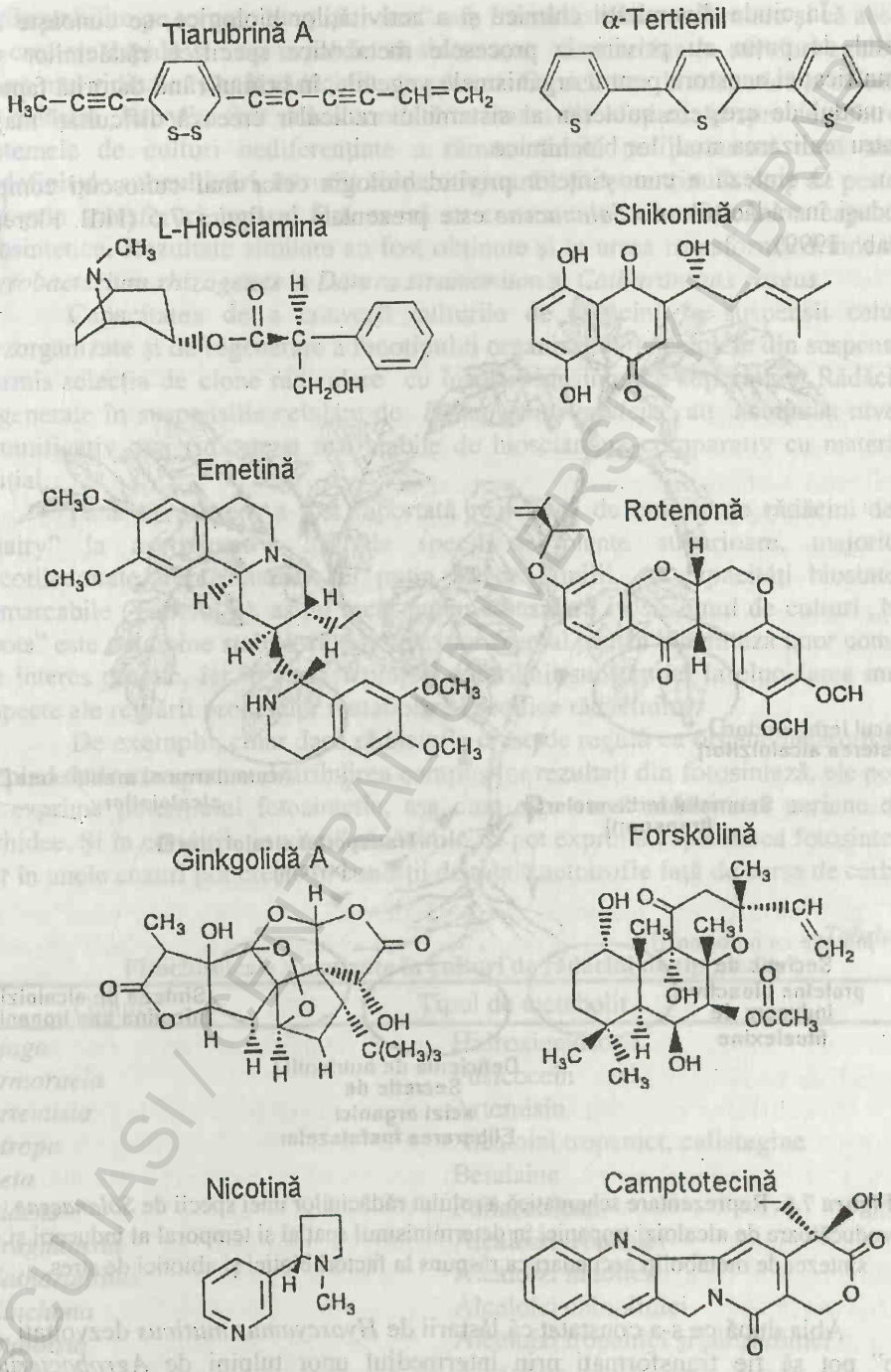


Figura 7.5. Structura chimică a unor metaboliți secundari sintetizați în rădăcini.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În ciuda diversității chimice și a activităților biologice, se cunoaște încă destul de puțin cu privire la procesele metabolice specifice rădăcinilor și a semnificației acestora pentru organismele vegetale, în primul rând datorită faptului că modul de creștere subteran al sistemului radicular creează dificultăți majore pentru realizarea studiilor biochimice.

O sinteză a cunoștințelor privind biologia celor mai cunoscuți compuși produși în rădăcinile de *Solanaceae* este prezentată în figura 7.6 (H.E. Flores și colab., 1999).

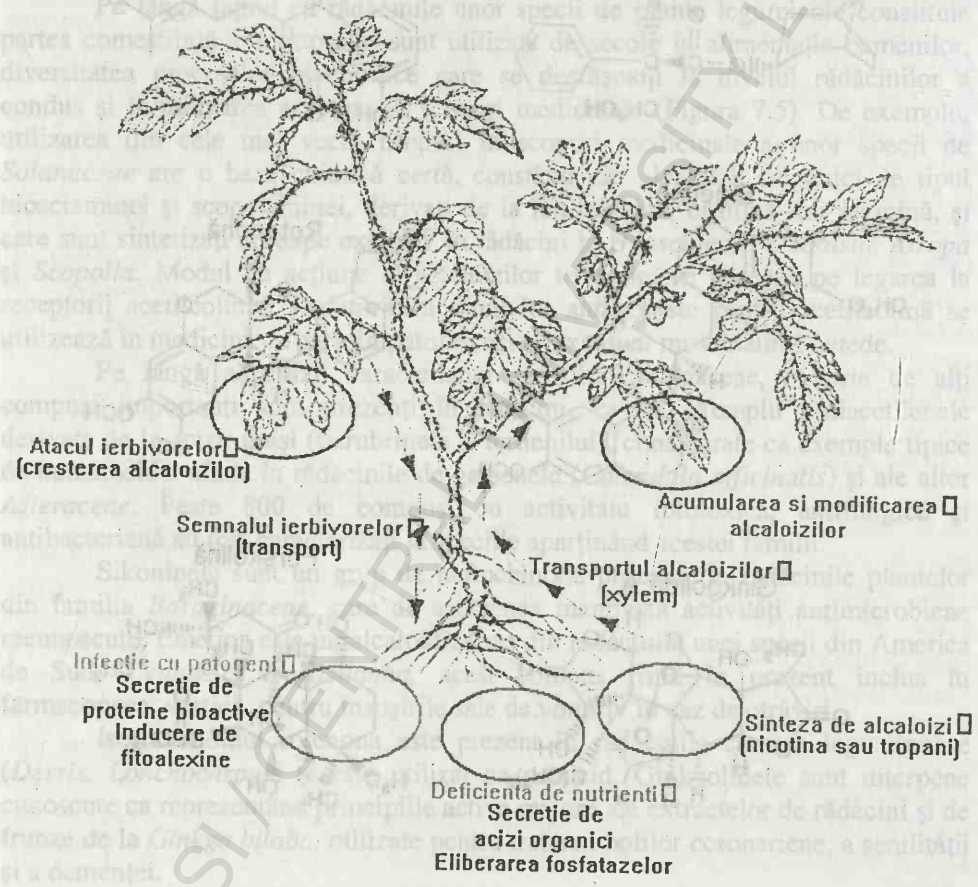


Figura 7.6. Reprezentare schematică a rolului rădăcinilor unei specii de *Solanaceae* producătoare de alcaloizi tropanici în determinismul spațial și temporal al inducerii și sintezei de metaboliți secundari ca răspuns la factori biotici și abiotici de stres.

Abia după ce s-a constatat că lăstarii de *Hyoscyamus muticus* dezvoltați „in vitro" pot să fie transformați prin intermediul unor tulpini de *Agrobacterium rhizogenes,* astfel încât să dezvolte rădăcini firoase la situsul de infecție (F.P. Medina-Bolivar și H.E. Flores, 1995), cercetările privind metabolismul radicular s-au bucurat de o revigorare fără precedent. S-a demonstrat că rădăcinile „hairy" pot

să fie stabilite pe termen lung „in vitro" sub formă de clone radiculare şi că acestea au creştere rapidă şi sunt capabile să sintetizeze hiosciamina la niveluri egale sau chiar mai ridicate decât rădăcinile *in planta*. Capacitatea biosintetică a culturilor de rădăcini „hairy" a fost strâns corelată cu starea diferenţiată, şi spre deosebire de sistemele de culturi nediferenţiate a rămas stabilă pe parcursul unui număr nedefinit de subcultivări, întrucât clona originară a fost menţinută timp de peste 15 ani prin transferuri lunare, fără ca să se constate vreo modificare a capacităţii biosintetice. Rezultate similare au fost obţinute şi în urma transformării induse de *Agrobacterium rhizogenes* la *Datura stramonium* şi *Catharanthus roseus*.

Capacitatea de a converti culturile de rădăcini în suspensii celulare dezorganizate şi de regenerare a fenotipului organizat de la celulele din suspensii a permis selecţia de clone radiculare cu însuşiri biosintetice superioare. Rădăcinile regenerate în suspensiile celulare de *Hyoscyamus muticus* au acumulat niveluri semnificativ mai ridicate şi mai stabile de hiosciamina comparativ cu materialul iniţial.

Până în prezent a fost raportată realizarea de culturi de rădăcini de tip „hairy" la aproximativ 200 de specii de plante superioare, majoritatea dicotiledonate, reprezentând cel puţin 30 de familii, cu capacităţi biosintetice remarcabile (Tabelul 3), astfel încât putem considera că sistemul de culturi „hairy roots" este deja bine stabilit ca sistem experimental pentru biosinteza unor compuşi de interes practic, iar în acelaşi timp a contribuit substanţial la elucidarea multor aspecte ale reglării proceselor metabolice specifice rădăcinilor.

De exemplu, chiar dacă rădăcinile cresc de regulă ca organe heterotrofe, şi depind de frunze pentru distribuirea compuşilor rezultaţi din fotosinteză, ele pot să-şi exprime potenţialul fotosintetic, aşa cum este cazul rădăcinilor aeriene de la orhidee. Şi în condiţii „in vitro" rădăcinile îşi pot exprima capacitatea fotosintetică, iar în unele cazuri pot creşte în condiţii de totală autotrofie faţă de sursa de carbon.

Tabelul 7.4

Fitochimicale sintetizate în culturi de rădăcini de tip „hairy"

Genul	Tipul de metabolit
Ajuga	Hidroxiecidsone
Armoracia	Fusicoccin
Artemisia	Artemisin
Atropa	Alcaloizi tropanici, calistegine
Beta	Betalaine
Bidens	Poliacetilene
Brugmansia	Alcaloizi tropanici
Catharanthus	Alcaloizi indolici
Cinchona	Alcaloizi chinolinici
Duboisia	Alcaloizi tropanici şi pirolidinici
Echinacea	Alkamide
Hyosciamus	Alcaloizi tropanici, sesquiterpene
Lithospermum	Naftochinone (shikonin)

Lobelia	Poliacetilene
Nicotiana	Alcaloizi pirolidinici
Panax	Ginsenoside
Rauwolfia	Alcaloizi indolici
Rubia	Antrachinone
Salvia	Diterpenoizi
Serratula	Ecdisteroizi
Solanum	Solasodina
Tagetes	Tiofene, poliacetilene
Trichosanthes	Acid brionolic
Valeriana	Diesteri iridoidici

Modificările survenite în asimilarea carbonului determină modificări dramatice ale tipului de fitochimicale produse în culturile de rădacini oferind astfel posibilitatea studiului coordonării dintre metabolismul primar şi secundar.

Culturile de rădăcini „hairy" sunt capabile să transforme xenobioticele, aşa cum s-a demonstrat în cazul rădăcinilor de la Asteraceae, care pot să preia şi să dimerizeze hidroxitoluenul butilat, rezultatul fiind o stilben-chinonă. Produsul biotransformat demonstrează activitate antifungică, spre deosebire de precursorul xenobiotic care este relativ inert.

Culturile de rădăcini firose pot să fie co-cultivate cu alte organisme, de o semnificaţie practică deosebită fiind co-cultivarea în condiţii axenice cu fungi micorizali. Culturile de rădăcini firoase de la *Daucus carota* au fost co-cultivate cu câteva specii de fungi vezicular-arbusculari din genul *Glomus.* În unele cazuri s-a realizat sporularea pronunţată a fungilor, fapt ce sugerează posibilitatea utilizării acestui sistem pentru producerea pe scară largă de inoculi micorizali în culturi axenice, în bioreactoare. Stabilirea simbiozelor cu fungi vezicular-arbusculari „in vitro" pare să afecteze metabolismul secundar al rădăcinilor, aşa cum s-a şi demonstrat în cazul lui *Glomus intraradices,* care a indus acumularea unui glicozid terpenoid în rădăcinile de *Hordeum vulgare.* De asemenea, co-cultivarea rădăcinilor de tip „hairy" de la *Catharanthus roseus* cu fungul micorizal *Acaulospora scrobiculata* influenţează efectul inhibitor al fosforului asupra producerii de alcaloizi indolici.

Co-cultivarea rădăcinilor „hairy" se poate realiza şi cu alte organisme, ca de exemplu cu nematozii sau cu insectele, fapt ce permite studiul biologiei acestor daunatori. H.E. Flores şi colab. (1999) menţionează realizarea co-cultivării rădăcinilor firoase de la *Daucus carota* cu nematodul *Pratylenchus,* acesta din urmă fiind capabil să inducă aceleaşi simptome, constând din hipertrofierea vârfului radicular, caracteristice infecţiei produse în sol. Folosind un sistem similar constând din rădăcini transformate de la *Trifolium repens* f. *lodigense* s-a realizat o analiză detaliată a reproducerii nematodului *Pratilenchus penetrans.* În co-culturi de rădăcini „hairy" de la *Carthamus tinctorius* cu specii de afide, insecte care se hrănesc cu substanţe din floemul plantelor, acestea s-au reprodus partenogenetic şi au fost menţinute o perioada de peste doi ani ca populaţii stabile, timp în care au

indus modificări în metabolismul rădăcinilor prin sinteza de poliacetilene specifice, probabil ca raspuns de apărare al celulelor radiculare.

Au fost experimentate câteva strategii de modificare a conținutului în alcaloizi al culturilor de rădăcini transformate. Expunerea rădăcinilor „hairy" de la *C. roseus* la elicitori de tipul pectinazelor sau a acidului jasmonic a condus la creşterea conținutului în tabersonină, ajmalicină, serpentină, lochnericină şi horhamericină, iar utilizarea răşinilor amberlitice a stimulat producerea de ajmalicină şi catarantină. Culturile de rădăcini firoase de la *H. muticus* cescute în condiții de stres hidric au acumulat prolină şi hiosciamină, iar expunerea la un elicitor preparat din *Rhizoctonia solani* nu a influențat producerea de alcaloizi tropanici dar în schimb a indus secreția unor cantități masive de fitoalexine sesquiterpenice.

Sistemul radicular al plantelor excelează prin eliminarea în rizosferă a unor exudate bioactive şi poate cu excepția granulelor de polen în faza germinării, nici un alt organ al plantei nu poate rivaliza cu rădăcinile din acest punct de vedere. Pe lângă fitoalexine, exudatele radiculare sunt bogate în acizi organici, a căror sinteză este indusă ca răspuns la limitarea fosforului disponibil şi care influențează indirect, prin modificarea pH-ului, populațiile microbiene din sol. Studii aprofundate s-au concentrat pe investigarea semnificației biologice a naftochinonelor desemnate sub numele colectiv de shikonine, produse de rădăcinile de *Lithospermum erythrorhizon.* Aceşti compuşi sunt în esență derivați ai geranil-pirofosfatului şi ai fenilalaninei şi se acumulează în cantități ridicate (3-5% greutate uscată) în rădăcinile plantelor în vârstă de 3-5 ani. Pe lângă proprietățile medicinale ale shikoninelor, fiind utilizate în tratamentul infecțiilor cutanate, s-a constatat că aceşti compuşi manifestă activitate inhibitoare selectivă pentru o serie de bacterii şi fungi din sol. Interesant este faptul că shikoninele inhibă bacterii patogene din sol, cum este *Pseudomonas solanacearum,* dar nu afectează alte specii de *Pseudomonas* care sunt folosite ca agenți de biocontrol. În mod similar este dramatic inhibată creşterea hifelor unor fungi patogeni ca *Pythium aphanidermatum, P. ultimum* sau *Rhizoctonia solani,* dar nu afectează creşterea fungilor micorizali ca *Glomus intraradices.* Studiile efectuate „in vitro" în culturi de rădăcini firoase co-cultivate cu agenți patogeni au evidențiat faptul că producerea de shikonine este strâns controlată fiziologic în spațiu şi timp şi este corelată cu stresul biotic, încadrându-se în mecanismele de apărare ale plantei împotriva agenților patogeni din sol.

Pe lângă o serie de compuşi cu greutate moleculară mică, rădăcinile pot să acumuleze polimeri de tipul amidonului, fructanilor şi proteinelor. În cea mai mare parte, polipeptidele prezente în rădăcinile de rezervă constitue surse de azot şi de sulf pentru lăstarii care se dezvoltă la un moment dat, după o perioadă de latență, dar aceste proteine manifestă şi activitate biologică. De exemplu, exprimarea sporaminei, principala proteină de rezervă din rădăcinile tuberizate de la batat, este corelată şi cu efectul de inhibitor tripsinic, ca răspuns la factori biotici de stres. De altfel, pe lângă proteinele de rezervă care pot avea funcții multiple, există în rădăcini şi o gama largă de proteine cu funcții certe în procesele de apărare, cum

sunt glucanazele, chitinazele şi proteinele de inactivare ribosomice (RIPs). Acestea din urmă, datorită activităţii lor N-glicozidazice, blochează sinteza proteinelor, şi ca urmare manifestă efect anti-fungic, anti-bacterian, insecticid şi antiviral.

Capacitatea de a stabili culturi de rădăcini în cazul multor specii de plante şi de a manipula metabolismul radicular deschide noi perspective studiilor privind interacţiile dintre sistemul radicular şi diferite organisme din rizosfera pe de o parte, iar pe de altă parte oferă baza ştiinţifică pentru modularea potenţialului biosintetic al sistemului radicular atât la nivelul plantei întregi cât şi în culturi de rădăcini. Dar întrucât *Agrobacterium rhizogenes* nu numai că induce rădăcini de tip „hairy" în urma unor infecţii experimentale, dar poate servi şi ca vector pentru transfer de gene în scopul ingineriei previzibile a proceselor metabolice specifice sistemului radicular, aceasta deschide noi orizonturi pentru exploatarea potenţialului biologic şi biosintetic al aşa-numitei „jumătăţi ascunse" a organismelor vegetale (H. E. Flores şi colab., 1996).

7.2.2. Abordări curente şi perspective în ingineria metabolică vegetală

Capacitatea de a controla rata proceselor metabolice ca răspuns la modificări survenite în mediul intern sau în cel extern constituie un atribut indispensabil al celulelor vii. Complexitatea metabolică a celulelor este reflectată de numărul reacţiilor enzimatice separate care reprezintă căile metabolice, suma acestora din urmă constituind metabolismul. Activitatea enzimatică este unul dintre factorii majori care influenţează magnitudinea fluxurilor metabolice în orice celulă, fiecare reacţie la nivel celular fiind catalizată de propia enzimă. Cu toate că un procariot „simplu" precum *Escherichia coli* are o dimensiune de 1/500 din cea a unei celule eucariote tipice, fiecare celulă de *E. coli* conţine aproximativ 3000 de proteine diferite, 90% dintre acestea fiind enzime.

Conform conceptului unităţii biochimice, în ciuda complexităţii metabolismului tipurile de substrate, co-substrate, co-factori, sursa de energie, tipurile de căi metabolice şi mecanismele de control ale acestora sunt comune pentru majoritatea celulelor. În ceea ce priveşte însă detaliile reglatoare, acestea diferă mult, nu numai de la specie la specie, dar chiar la diferitele tipuri celulare ale aceluiaşi organism, sau la diferitele organite ale unei celule.

Ingineria metabolică este definită ca redirecţionarea uneia sau mai multor reacţii enzimatice pentru a produce noi compuşi într-un organism, pentru a îmbunătăţi producerea compuşilor existenţi sau pentru a media degradarea unor compuşi. Acest nou domeniu îşi propune ameliorarea activităţilor celulare utilizând tehnologia ADN recombinant, respectiv inserând în genomul plantelor gene care codifică pentru enzime specifice.

Tehnicile ingineriei genetice au posibilitatea de a manipula după dorinţă expresia genelor în plantele transgenice, dar capacitatea noastră de a prevedea efectele asupra metabolismului nu atinge în prezent acelaşi nivel, devenind evident

faptul că numai informaţia genetică nu este suficientă pentru a putea deduce proprietăţile unei proteine sau kinetica şi însuşirile reglatoare ale unei enzime. Având în vedere cei peste 100.000 de compuşi unici produşi în regnul vegetal şi complexitatea reţelelor de căi metabolice care funcţionează la nivel celular şi la nivel de organism, remodelarea metabolismului după dorinţă constituie o adevărată provocare pentru ingineria metabolică.

Cu puţine excepţii, cercetările din domeniul ingineriei metabolice vegetale s-au axat pe modificarea expresiei unor gene unice; s-a urmărit mai curând conversia sau modificarea unui compus existent într-un alt compus decât creşterea fluxului căilor metabolice, iar modificarea metabolismului secundar a înregistrat mai multe succese comparativ cu metabolismul primar şi intermediar.

În general, modificarea proceselor metabolice prin inginerie genetică se poate realiza fie prin supraexpresia sau prin blocarea expresiei genelor endogene, fie prin introducerea genelor heteroloage care extind sau schimbă o cale metabolică. Prin supraexpresia unei gene care reglează activitatea unei căi metabolice se poate obţine creşterea produsului final dorit, iar blocarea expresiei unei gene-cheie poate spori nivelul unui produs intermediar de interes, poate preveni acumularea unui produs final nedorit sau se poate amplifica fluxul pe o ramura a căii metabolice care produce un compus mai valoros. În toate cazurile, succesele înregistrate în ingineria metabolică au fost condiţionate nu numai de rafinamentul metodelor de transfer genic, ci şi de cunoaşterea detaliată a cât mai multor procese biosintetice, a modului în care enzimele realizează agregarea în sisteme multienzimatice sau *metaboloame*, şi disoluţia reversibilă a acestora ca mecanisme de control al metabolismului (D. DellaPenna, 2001; W. Paxton, 2004).

7.2.2.1. Genetica şi biochimia biosintezei antocianilor

Flavonoizii reprezintă o clasă importantă de metaboliţi secundari a căror biosinteză este destul de bine cunoscută pentru a fi recomandaţi drept candidaţi favoriţi pentru abordările de inginerie metabolică.

Flavonoizii derivă de la fenilalanină şi malonil CoA, constau din două inele aromatice cu şase atomi de carbon, conectate printr-o punte din trei atomi de carbon şi includ antociani, flavone, flavonoli. Diferenţele dintre diferitele tipuri de flavonoizi sunt date de măsura în care se petrec oxidări la nivelul punţii celor trei atomi de carbon. Funcţiile flavonoizilor sunt multiple, acţionând ca fitoalexine, ca semnale pentru microorganisme simbiotice, ca protectori faţă de UV sau ca pigmenţi. Antocianii sunt principalii pigmenţi florali, dar uneori flavonele şi flavonoizii îndeplinesc functii de co-pigmenţi. Nuanţa pigmentului antocianic este determinată de numărul grupărilor hidroxil şi metoxil prezente la inelul din şase atomi de carbon derivat de la fenilalanină.

Recent, multe gene implicate în biosinteza antocianilor au fost izolate şi caracterizate folosind tehnologia ADN recombinant aplicată la trei specii model: *Zea mays, Antirrhinum majus* şi *Petunia hybrida.* Cu toate că la aceste trei specii procesele biosintetice sunt asemănătoare, desfăşurându-se după modelul general prezentat în fig. 7.7, există unele diferenţe importante între tipurile de antociani

produse de fiecare specie. O diferență majoră constă în faptul că Petunia nu produce de regulă pigmenți pelargonidinici, în timp ce porumbul și gura-leului nu produc pigmenți delfinidinici.

Precursorii pentru sinteza tuturor flavonoizilor, inclusiv a antocianilor sunt malonil-CoA și p-cumaroil-CoA. Enzima calcone-sintaza (CHS) catalizează condensarea treptată a trei unități acetat de la malonil-CoA cu *p*-cumaroil-CoA, rezultând tetrahidroxicalcone.

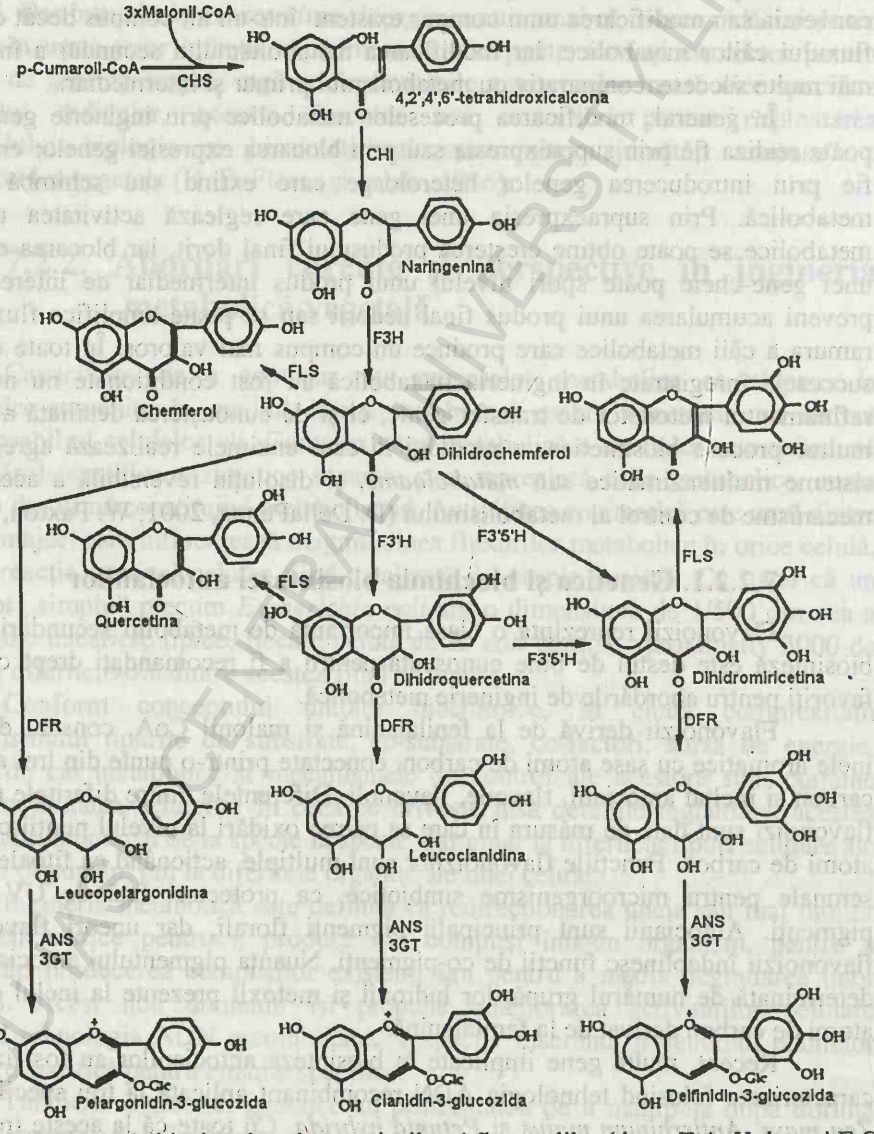


Figura 7.7. Procesele biosintetice ale antocianilor și flavonolilor (dupa T.A. Holton și E.C. Cornish, 1995).

În continuare, calcone-isomeraza (CHI) catalizează isomerizarea stereospecifică a tetrahidroxicalconelor de culoare galbenă pentru a forma naringeninul incolor. Acesta din urmă este apoi convertit în dihidrokaemferol (DHK) de către flavanon-3-hidroxilaza (F3H). Flavonoid-3'-hidroxilaza (F3'H) produce hidroxilarea DHK pentru a produce dihidroquercitin (DHQ), iar sub acțiunea flavonoid 3',5'-hidroxilazei (F3'5'H) se produce dihidromiricetin (DHM).

Cel puțin trei enzime sunt necesare pentru convertirea dihidroflavonelor incolore (DHK, DHQ si DHM) în antociani. Prima dintre aceste conversii enzimatice constă în reducerea dihidroflavonolilor în flavan-3,4-cis-diols (leucoantocianidine) de către dihidroxiflavonol 4- reductaza (DFR). Prin oxidarea, dehidrarea şi glicozilarea diferitelor leucoantocianidine rezultă pelargonidina de culoare caramizie, cianidina de culoare roşie şi pigmenții delfinidinici albaştri. La multe specii, între care şi Petunia (Figura 7.8), antocianidin 3-glucosizii pot fi modificați mai departe prin glicosilare, metilare şi acilare ceea ce determină diferențele de pigmentare care se manifestă la diferite specii şi varietăți.

În ce priveşte genele structurale care codifică pentru enzimele implicate în biosinteza antocianilor, prima dintre acestea care a fost izolată de la patrunjel este gena pentru chalcon-sintaza (CHS). Ulterior s-a demonstrat că în genomul de la Petunia există 12 gene diferite pentru CHS, dar numai 4 dintre acestea (*chsA, chsB, chsG si chsJ)* se exprimă în plantulele iradiate cu UV, în timp ce în țesuturile florale se exprimă numai genele *chsA* şi *chsJ*. La porumb au fost izolate 2 gene care codifică pentru CHS: *c2* implicată în biosinteza de antociani în semințe şi *whp* care controlează activitatea CHS în polen. Locusul *nivea* controlează activitatea enzimei CHS în florile de gura-leului şi este singura genă CHS prezentă în genomul acestei specii.

Rareori se întâmplă să se acumuleze chalconele în țesuturile vegetale, deoarece acestea sunt rapid isomerizate de către CHI pentru a forma naringenin. Se cunosc însă şi cazuri când chalconele se acumulează în țesuturi, cum este cazul corolelor de la *Callistephus chinensis* şi *Dianthus caryophyllus* care, fiind lipsite de activitate CHI, produc flori galbene datorită acumulării pigmenților chalconici.

Petunia hybrida are două gene CHI care au fost izolate şi caracterizate: *chiA* care se exprimă în toate țesuturile florale şi în plantulele iradiate cu UV, şi *chiB* care se exprimă numai în anterele imature. Genele pentru CHI de la gura-leului şi de la porumb au fost izolate prin omologie cu gene CHI clonate anterior, iar datele obținute prin RFLP au evidențiat faptul că unele linii de porumb pot conține trei loci cu secvențe CHI omoloage, ceea ce explică lipsa mutantelor CHI la porumb.

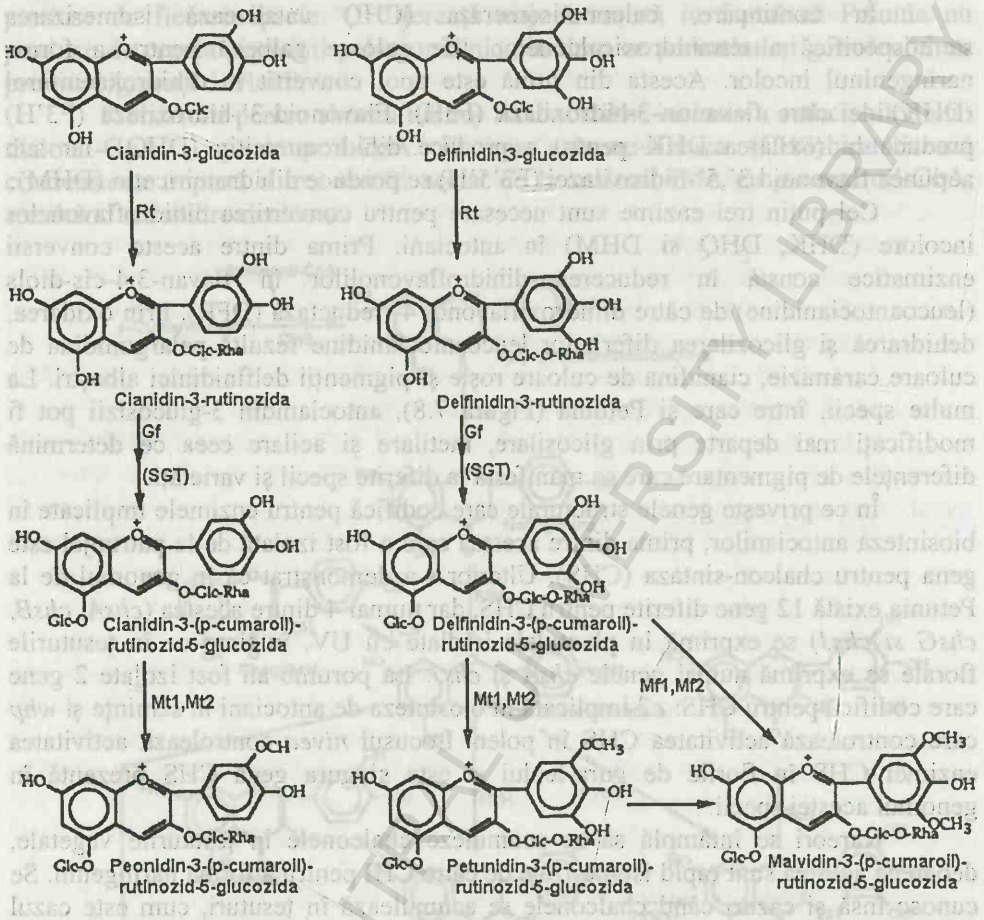


Figura 7.8. Controlul genetic al modificării antocianilor la Petunia.
Glc, glucoza; Rha, rhamnoza (dupa T.A.Holton şi E.C.Cornish,1995).

Locusul *incolorata* de la gura-leului codifică pentru enzima F3H, în timp ce la Petunia a fost identificat locusul *An3* pentru aceeaşi enzimă.

Doi loci genetici, *Ht1* şi *Ht2* controlează activitatea enzimei F3'H în florile de Petunia. La porumb enzima flavonoid 3'-hydroxilaza este codificată de locusul *Pr*. Aleurona plantelor *Pr* este purpurie datorită acumulării preponderente a cianidin glucosidelor, în timp ce aleurona plantelor *pr* este roşie, datorită acumulării cu predilecţie a pelargonidin-glucosidelor. Atât kaempferolul (un flavonol), cât şi naringeninul (o flavanona) şi apigeninul (o flavona), împreună constituie substratul pentru hidrolază.

Activitatea enzimei dihidroflavonol 4-reductaza (DFR) este controlată la Petunia de trei gene diferite *(dfrA, dfrB,si dfrC),* dar numai gena *dfrA* este transcrisă în ţesuturile florale. Enzima DFR converteşte preferenţial DHM în leucodelfinidin, în timp ce DHQ este un substrat slab, iar DHK nu este convertit în leucopelargonidin. Această specificitate de substrat explică acumularea preferenţială a derivaţilor delfinidinului şi lipsa pigmenţilor pelargonidinici la Petunia.

Treptele activității enzimatice ale catalizării conversiei leucoantocianidinelor în antociani colorați nu sunt încă bine caracterizate. Genele *A2* de la porumb și *Candica* de la gura-leului implicate în conversia leucoantocianinelor în antocianidine prezintă similitudini ale secvențelor cu gene *ant17* de la Petunia, și în consecință se admite că cele trei proteine codificate au aceeași activitate enzimatică – antocianidin-sintaza sau ANS.

Dihidroflavonolii sunt precursori atât ai antocianilor cât și ai flavonolilor, care la majoritatea plantelor sunt sintetizați în aceeași celula și de regulă se acumulează în aceeași locație subcelulară. Dihidroflavonolii constituie substratul pentru DFR, FLS, F3'H și F3'5'H, și prin urmare există posibilitatea instalării unor competiții pentru fiecare dintre aceste enzime pentru substratul comun. Dacă ambele enzime – F3'H și F3'5'H sunt prezente la Petunia, se formează cu preponderență antocianine 3',5'-hidroxilate, probabil datorită specificității de substrat a enzimelor implicate în conversia dihidroflavonolilor în antocianine. Cantități ridicate de derivați cianidinici se acumulează numai la liniile de Petunia care posedă activitate F3'H dar sunt lipsite de activitate F3'5'H și FLS. Rezultă că acumularea unor flavonoizi specifici depinde atât de enzimele produse cât și de relativa lor specificitate de substrat, iar Petunia oferă un model ideal pentru testarea competiției și interacției dintre enzimele care modifică flavonoizii, datorită existenței la Petunia a unor mutante bine caracterizate și a unui sistem simplu de transformare.

Genele reglatoare care controlează expresia genelor structurale ale proceselor biosintezei antocianilor au fost de asemenea identificate la multe specii de plante. Aceste gene influențează intensitatea și modelul biosintezei antocianilor și în general controlează expresia multor gene structurale diferite.

Familia genelor *R* determină momentul, distribuirea și cantitatea pigmenților antocianici la porumb. Această familie cuprinde un set de gene reglatoare corespunzător locusului *R* (care include *S, Lc* și *Sn)* și locusului *B*, fiecare genă determinând pigmentația unei părți diferite a plantei.

În florile de gura-leului au fost identificate trei gene antocianice reglatoare, și anume *Delila (Del), Eluta* și *Rosea* care reglează nivelul biosintezelor de antociani.

La Petunia au fost identificați patru loci (*An1, An2, An4* si *An11)* care au efecte reglatoare similare asupra transcrierii a cel puțin șase gene structurale care controlează biosinteza antocianilor. Studiile de clonare și caracterizare a genelor reglatoare ale biosintezei antocianilor atât de la cele trei specii model (porumb, petunia și gura-leului) cât și de la alte specii precum tutunul și *Arabidopsis* au evidențiat faptul că biosinteza antocianilor pare să fie mediată de factori similari la specii diferite.

Definirea funcțiilor biologice ale flavonoizilor la plante are conotații practice dintre cele mai importante. De exemplu, isoflavonoidele, recunoscute ca fiind compuși implicați în reacțiile de apărare ale plantelor față de patogeni, funcționează și ca molecule semnal în fixarea azotului numai la specii leguminoase și doar la câteva dintre speciile aparținând altor familii. Caracterizarea acestei căi metabolice la lucernă și la soia poate servi ca bază pentru ingineria metabolică a sintezei de isoflavonoide și la alte specii de plante.

Sorgul (*Sorghum bicolor*), porumbul și gloxinia *(Sinningia cardinalis)* fac parte dintre puținele specii cunoscute ca fiind capabile sa sintetizeze 3-deoxiantocianine, care sunt implicate atât în apărare cât și în pigmentație.

Analiza liniilor de porumb și de Petunia purtând mutații în ce privește prima enzimă a biosintezei flavonoizilor a evidențiat rolul acestora în fertilitatea masculină.

S-a demonstrat totodată că flavonoizii intervin în alegerea speciilor gazdă pentru microorganisme ca *Rhizobium sp.* şi *Agrobacterium sp.*, şi contribuie la recunoaşterea plantei gazdă de către plante parazite ca *Triphysaria versicolor* şi *Cuscuta subinclusa.*

Pe lângă aceste funcţii biologice foarte specializate, flavonoizii au şi unele funcţii aparent universale în lumea plantelor, ca de exemplu protejarea plantelor de radiaţiile UV sau menţinerea seminţelor în starea de dormanţă. Chiar şi teoria mult timp controversată conform căreia flavonoizii funcţionează ca inhibitori ai transportului auxinelor capătă în prezent suport ştiinţific prin studiile efectuate pe mutante de la *Arabidopsis.*

În plus, metabolismul flavonoizilor şi în general al fenilpropanoizilor serveşte ca model experimental pentru înţelegerea organizării intracelulare a metabolismului, a canalizării compuşilor intermediari şi a asamblării complexelor multienzimatice.

Izolarea şi caracterizarea genelor structurale şi reglatoare care coordonează metabolismul flavonoizilor a stimulat interesul pentru ingineria acestuia la diferite specii de plante de interes pentru industria horticolă. Progresele înregistrate recent în biologia moleculară, în special în izolarea şi transferul genelor între diferite specii, au sugerat şi posibilitatea modificării culorii florilor, fie prin introducerea unor gene care codifică pentru noi activităţi enzimatice, fie prin inactivarea unor gene endogene.

Crearea de plante transgenice de Petunia cu flori care conţin pelargonidin a fost primul exemplu de creare a unei noi culori florale prin inginerie genetică. În general, DFR de la petunia catalizează conversia DHK, DHQ şi a DHM în respectivele leucoantocianidine, dar nu poate converti DHK în leucopelargonidin, ceea ce explică lipsa pigmenţilor pelargonidinici la Petunia în condiţii naturale. În urma transformării cu o genă DFR de la porumb *(A1),* care este capabilă să convertească DHK în leucopelargonidin, a fost posibilă producerea de pelargonidin în florile de Petunia, rezultatul fiind modificarea culorii de la roz-pal la roşu-cărămiziu.

Activitatea CHS poate fi redusă sau eliminată la plante prin transformarea cu o versiune antisens a genei CHS, dar modificarea culorii unor flori s-a realizat cu succes mai ales după descoperirea fenomenului de „represie sens" sau „corepresie". Aceasta se produce atunci când extra-copii „sens" ale unei gene sunt introduse în genomul unui organism.

Ambele tehnologii – antisens şi de corepresie - sunt utilizate pentru modificarea culorii florilor prin reducerea sau eliminarea expresiei unor gene implicate în sinteza pigmenţilor florali, aşa cum s-a demonstrat la petunie, tutun, crizanteme şi trandafir. Folosind strategii similare, există posibilitatea modificării culorii fructelor, întrucât multe gene implicate în biosinteza antocianilor au fost izolate de la vita de vie şi de la măr.

La multe specii de plante ornamentale importante, precum garoafele, crizantemele şi tradafirii, lipseşte culorea albastră a petalelor în condiţii naturale, întrucât nici una dintre aceste specii nu este capabilă să producă pigmenţii albaştri delfinidinici. Transformarea acestor specii cu gene pentru F3'5'H permite depaşirea acestei limite, deoarece producerea de derivaţi delfinidinici sporeşte posibilitatea producerii de flori albastre şi la aceste specii, cu toate că numai sinteza pigmentului albastru delfinidin nu este suficientă, ci trebuie să se realizeze şi un pH

potrivit în vacuole, unde se acumulează antocianii. În ultimii ani, s-a realizat izolarea unei gene pentru flavonoid 3',5'-hidroxilaza, care catalizează formarea de precursori delfinidinici hidroxilaţi corespunzător, respectiv la carbonii 3', 4' şi 5' ai unuia dintre inelele aromatice. Au fost identificate şi genele de la petunie care controlează pH-ul vacuolar, astfel încât producerea de flori cu petale albastre la specii la care această culoare lipseşte în condiţii naturale, devine o realitate.

Sunt de remarcat şi preocupările pentru ingineria metabolismului flavonoizilor în vederea sporirii valorii nutriţionale a plantelor. Astfel, o genă pentru chalcone-isomeraza de la petunie a fost transferată pentru a creşte nivelul flavonolilor în fructele tomatelor, fapt ce sporeşte valoarea nutriţională a acestora.

Datele ştiinţifice derivate din studiul biosintezei flavonoizilor la diferite specii de plante continuă să contribuie la elucidarea metabolismului celular în general şi la progresul ingineriei metabolice la cât mai multe specii de plante de interes agronomic sau horticol (R. Chassan, 1994; T.A. Holton şi E. D. Cornish, 1995; B. Winkel-Shirley, 2001).

7.2.2.2. Ingineria metabolismului alcaloizilor

Utilizaţi din cele mai vechi timpuri pentru proprietăţile lor medicinale şi toxicologice, alcaloizii constitue un grup foarte diversificat de compuşi cu azot întâlniţi la aproximativ 20% dintre speciile de plante. După identificarea de către Serturner în 1806 a primului alcaloid, morfina, în planta *Papaver somniferum,* aproximativ 12.000 de alcaloizi au fost izolaţi şi structura lor a fost elucidată. Folosirea extractelor vegetale cu alcaloizi sub formă de ceaiuri, infuzii, medicamente şi otrăvuri datează încă de la începuturile civilizaţiei. Au rămas în istorie moartea lui Socrates în 339 B.C. ca urmare a consumării unei infuzii de cucută (*Conium maculatum*) care conţine alcaloidul foarte toxic – coniina, sau legenda după care Cleopatra folosea extracte de *Hyoscyamus muticus* care conţin atropină pentru a-şi dilata pupilele, practică preluată şi de femeile europene din Evul Mediu care foloseau în acelaşi scop extracte de *Atropa belladonna.* Şi în zilele noastre un derivat sintetic al atropinei, tropicamida, este folosit în mod curent în examinările oftalmologice. Un tonic preparat din scoarţă de *Cinchona officinalis* care conţine medicamentul antimalaric chinina a facilitat explorarea şi popularea multor regiuni tropicale în ultimele două secole.

Activitatea biologică evidentă a unor alcaloizi a condus prin urmare la exploatarea lor ca farmaceutice, stimulante, narcotice şi otrăvuri. Numeroase medicamente conţinând alcaloizi au origine vegetală (Figura 7.9), şi sunt folosite fie sub formă de ceaiuri sau extracte, fie sub formă de compuşi purificaţi, cum este de exemplu narcoticul analgezic morfina, produsul analgezic şi antitusiv codeina, agenţii anticancerigeni vincristin, vinblastin şi taxol, colchicina folosită în tratarea gutei, relaxantul muscular (+)-tubocurarina, ajmalicina utilizată în tratarea aritmiilor, antibioticul sanguinarina şi sedativul scopolamina. Alţi alcaloizi importanţi de origine vegetală includ cofeina, nicotina, cocaina şi heroina, care este un derivat sintetic al O,O-morfinacetilatului.

Compuşii naturali au servit şi ca modele pentru unele medicamente sintetice moderne, ca de pildă atropina pentru tropicamidă, chinina pentru clorochină şi cocaina pentru procaină şi tetracaină. De altfel noi medicamente continuă să fie descoperite, cele mai recente exemple fiind alcaloizii cu efect

anticanceros - taxol, extras din *Taxus brevifolia* şi camptotecinul, extras din *Camptotheca acuminata.*

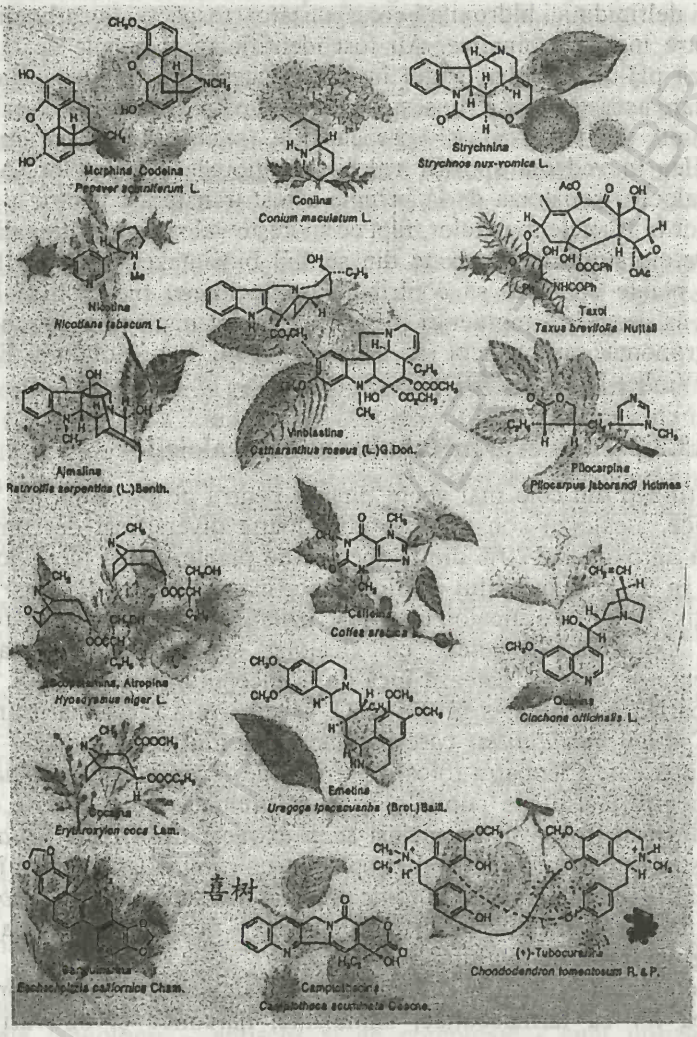


Figura 7.9. Alcaloizi naturali fiziologic activi (dupa T.M. Kutchan, 1995).

Cu toate că există în prezent numeroase date privind efectele farmacologice ale alcaloizilor, se cunoaşte foarte puţin în ceea ce priveşte biosinteza acestor compuşi şi reglarea acesteia, datorită în mare parte structurii stereochimice complexe a majorităţii alcaloizilor, care conţin centri asimetrici multipli. Asfel, deşi nicotina, care conţine un centru asimetric, a fost descoperită în 1828, structura sa a fost descrisă abia în 1904, iar morfinei, care conţine cinci centri asimetrici i s-a elucidat structura abia în 1952, după 146 de ani de la izolarea sa.

Progrese reale în identificarea, purificarea şi caracterizarea enzimelor implicate în biosinteza alcaloizilor s-au înregistrat după 1970, odată cu utilizarea culturilor de celule vegetale ca sisteme experimentale, cunoscându-se în prezent peste 80 de enzime care catalizează etape ale biosintezei alcaloizilor indolici, isochinolinici, tropanici, pirolizidinici şi purinici (Tabel nr. 5).

Tabelul 7.5.

Enzimele biosintezei alcaloizilor, pentru care au fost clonate genele corespunzătoare (după P.J. Facchini, 2001).

Enzima	Funcţia	Specia	Tipul
Biosinteza alcaloizilor monoterpenoid indolici			
TDC	Triptofan decarboxilaza	*Catharanthus roseus* *Camptotheca acuminata*	Decarboxilaza piridoxal-5'-fosfat-dependentă
STR	Strictosidin-sintaza	*Catharanthus roseus* *Rauwolfia serpentina*	Glicoproteina vacuolară
SGD	Strictosidin beta-D-glucosidaza	*Catharanthus roseus*	Glucosidaza asociată cu membrana
T16H	Tabersonin 16-hidroxilaza	*Catharanthus roseus*	Monooxigenaza P-450 dependentă
D4H	Desacetoxyvindoline 4-hidroxilaza	*Catharanthus roseus*	Dioxigenaza 2-oxo glutarat-dependentă
DAT	Deacetilvindolin-acetiltransferaza	*Catharanthus roseus*	Acetiltransferaza Acetyl CoA-dependentă
Biosinteza alcaloizilor benzilisochinolinici			
TYDC	Tirosin decarboxilaza	*Papaver somniferum*	Decarboxilaza piridoxal- 5'-fosfat -dependenta
6OMT	Norcoclaurin 6-O-metiltransferaza	*Coptis japonica*	O-metiltransferaza S-Adenosil-L-metionin dependentă
4'OMT	3'-Hidroxy-N-metilcoclaurin 4'-O-metiltransferaza	*Coptis japonica*	O-metiltransferaza S-Adenosil-L-metionin dependentă
OMT II; 1-4	Norcoclaurin 6-O-metiltransferaza	*Thalictrum tuberosum*	O-metiltransferaza S-Adenosil-L-metionin dependentă
CYP80A1	Berbamunin sintaza	*Berberis stolonifera*	Monooxigenaza P450-dependentă

CYP80B1	N-metilcoclaurin 3'-hidroxilaza	*Eschscholzia californica* *P.somniferum*	Monooxigenaza P450-dependentă
BBE	Enzima berberin „bridge"	*E. californica* *P.somniferum* *B. stolonifera*	Oxidoreductaza flavinilată
SOMT	Sculerin 9-O-metiltransferaza	*Coptis japonica*	O-metiltransferaza S-Adenosil-L-metionin dependentă
COR	Codeinon-reductaza	*P.somniferum*	Aldo/keto reductaza
Biosinteza alcaloizilor tropanici şi a nicotinei			
ODC	Ornitin decarboxilaza	*Datura stramonium*	Decarboxilaza piridoxal-5'-fosfat dependentă
PMT	Putrescin N-metiltransferaza	*Atropa belladona* *Nicotiana tabacum*	N-metiltransferaza S-Adenosil-L-metionin transferaza
TR-I	Tropinon-reductaza-I	*Datura stramonium*	Dehidrogenaza cu lanţ scurt
TR-II	Tropinon-reductaza-II	*Datura stramonium*	Dehidrogenaza cu lanţ scurt
H6H	Hiosciamin-6beta-hidroxilaza	*Hyoscyamus niger* *Atropa belladonna*	Dioxigenaza 2-oxoglutarat dependentă
Biosinteza alcaloizilor purinici			
CS	Cofein-sintaza	*Camelia sinensis*	N-metiltransferaza S-Adenosil-L-metionin-dependentă

. După 1990, aplicarea pe scară largă a tehnicilor moleculare a facilitat izolarea câtorva gene implicate în biosinteza alcaloizilor indolici, tropanici şi bensilisochinolinici şi au fost utilizate în ingineria genetică a acumulării alcaloizilor la plante.

Studiile privind localizarea tisulară a biosintezei alcaloizilor au evidenţiat faptul că enzime care catalizează secvenţe specifice pot să acţioneze în tipuri celulare distincte, şi ca urmare produşii proceselor metabolice intermediare trebuie să fie translocaţi între celule, fapt ce demonstrează odată mai mult complexitatea metabolismului acestor compuşi.

Alcaloizii terpenoid - indolici sunt în număr de peste 3000 şi printre produsele farmaceutice comercializate în prezent sunt de menţionat chinina, cu

efect antimalaric, izolată din *Cinchona officinalis,* camptotecina cu efect antineoplasmic izolată din *Camptotheca acuminata*, stricnina, otravă puternică şi medicament homeopatic extrasă din *Strychnos nux-vomica* şi agenţii chemoterapeutici antineoplasmici vincristin şi vinblastin extraşi din *Catharanthus roseus*. Au fost realizate progrese în identificarea enzimelor implicate în biosinteza alcaloizilor terpenoid-indolici, cum sunt triptofan decarboxilaza şi strictosidine sintaza.

Triptofan decarboxilaza, codificată de o singură genă la *Catharanthus roseus* şi de două gene reglate autonom la *Camptotheca acuminata*, catalizează convertirea aminoacidului L-triptofan în protoalcaloidul triptamină. Aceasta, împreună cu iridoid-glucozidul secologanin servesc drept substrat pentru enzima strictosidin-sintaza, care catalizează prima treaptă a sintezei acestei categorii de alcaloizi, şi anume formarea de 3*α*(S)-strictosidin, precursor comun al tuturor alcaloizilor monoterpenoid-indolici (Fig.10).

O singură genă, *str1* pare să codifice pentru strictosidin-sintaza, şi aceasta a fost izolată de la două specii – *Rauwolfia serpentina* şi *Catharanthus roseus*, transcripţii ale genei acumulându-se cu preponderenţă în rădăcinile şi frunzele plantelor mature. Faptul că există mai multe isoforme ale enzimei se explică prin modificările post-translaţionale ale unui singur precursor.

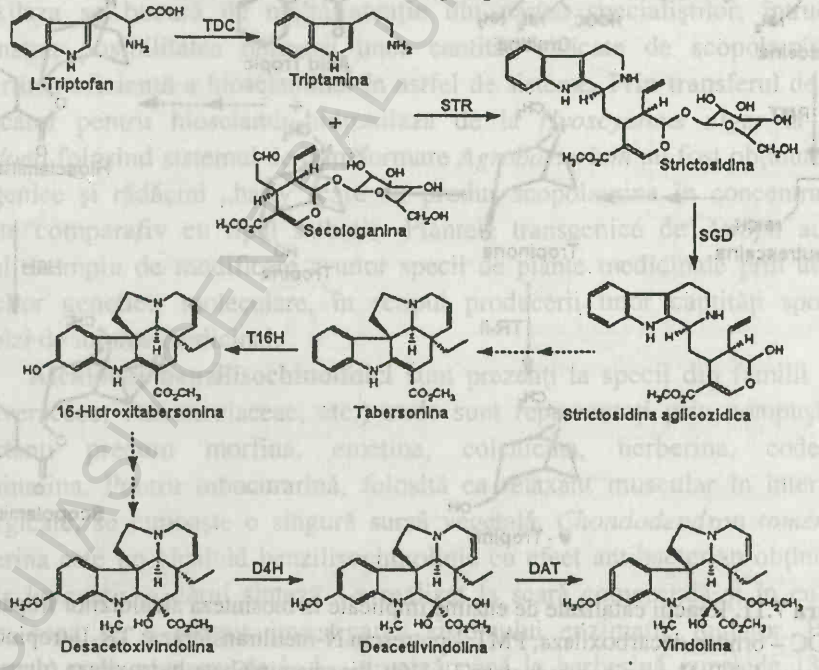


Figura 7.10. Reacţiile catalizate de enzime implicate în biosinteza alcaloizilor monoterpenoid-indolici.

TDC – triptofan decarboxilaza; STR – strictosidinsintaza; SGD – strictosidin beta-D-glucosidaza; t16H – tabersonin 16-hidroxilaza; D4H – desacetoxivindolin 4-hidroxilaza; DAT – deacetilvindolin 4-O-acetiltransferaza (dupa P.J. Facchini, 2001).

Strictosidina este deglucozilată şi convertită prin câtiva intermediari instabili în tabersonină iar aceasta, prin mai multe trepte enzimatice, este convertită în vindolină. În etapa finală, vindolina este cuplată cu catharantina de către o peroxidază nespecifică pentru a forma vinblastin.

Alcaloizii tropanici şi nicotina. Întâlniţi în principal la Solanaceae, alcaloizii tropanici constituie sursa medicamentelor anticolinergice atropina, hiosciamina şi scopolamina. Cocaina, un stimulant al sistemului nervos central, este un alcaloid tropanic prezent la o specie care nu aparţine familiei Solanaceae, şi anume la *Erythroxylon coca.* Cu toate că nicotina nu este membru al clasei tropanice, primele trepte ale biosintezei atât a alcaloizilor tropanici cât şi a nicotinei, pornind de la ornitină sau arginină, sunt comune metabolismului poliaminic (Figura 7.11).

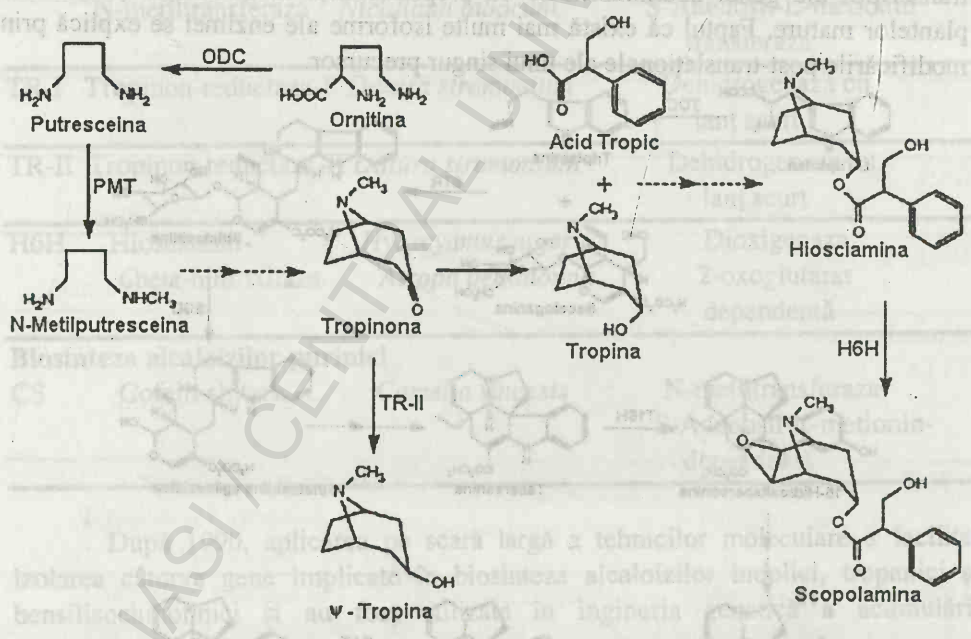


Figura 7.11. Reacţii catalizate de enzime implicate în biosinteza alcaloizilor tropanici. ODC – ornitin decarboxilaza; PMT – putrescin N-metiltransferaza; TR-I, tropinon reductaza-I; TR-II, tropinon reductaza-II; H6h, hiosciamin 6beta-hidroxilaza (dupa P.J. Facchini, 2001).

Hiosciamina rezultă prin condensarea tropinei cu acidul tropic, un intermediar derivat de la fenilalanina, şi este convertită în epoxidul sau – scopolamina - de către enzima hiosciamin 6 beta-hidroxilaza (Figura 7.12).

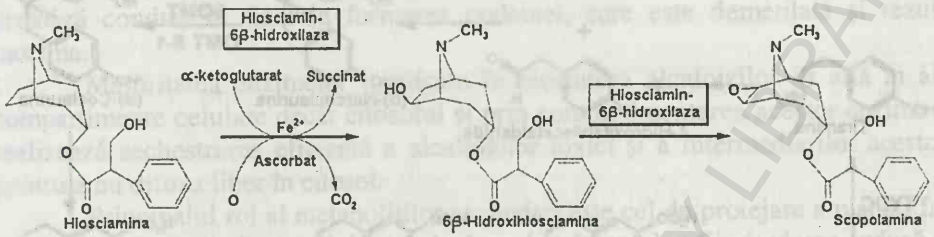


Figura 7.12. Reacţia catalizată de enzima hiosciamin 6 beta –hidroxilaza în procesul biosintezei alcaloidului tropanic scopolamina la specii ale genurilor *Hyoscyamus, Duboisia* şi *Datura.*

Enzima cheie a sintezei scopolaminei prin hidroliza hiosciaminei, hiosciamin-hidroxilaza, a fost izolată din periciclul rădăcinilor de *Hyoscyamus, Atropa, Scopolia* şi *Duboisia.* Producerea de alcaloizi de tipul scopolaminei în culturi de rădăcini „hairy" la care s-a transferat gena pentru enzima hiosciamin-hidroxilaza se bucură de multă atenţie din partea specialiştilor, întrucât s-a demonstrat posibilitatea obţinerii unor cantităţi ridicate de scopolamină prin convertirea eficientă a hiosciaminei în astfel de sisteme. Prin transferul de cDNA codificator pentru hiosciamin-hidroxilaza de la *Hyoscyamus niger* la *Atrapa belladona* folosind sistemul de transformare *Agrobacterium* au fost obţinute plante transgenice şi rădăcini „hairy" care au produs scopolamina în concentraţii mai ridicate comparativ cu tipul salbatic. Plantele transgenice de *Atropa* au oferit primul exemplu de modificare a unor specii de plante medicinale prin utilizarea tehnicilor geneticii moleculare, în scopul producerii unor cantităţi sporite de alcaloizi de interes medicinal.

Alcaloizii benzilisochinolinici sunt prezenţi la specii din familii diferite (Papaveraceae, Ranunculaceae, etc.) unde sunt reprezentaţi prin compuşi foarte importanţi precum morfina, emetina, colchicina, berberina, codeina şi sanguinarina. Pentru tubocurarină, folosită ca relaxant muscular în intervenţiile chirurgicale, se cunoaşte o singură sursă vegetală, *Chondodendron tomentosum.* Berberina este un alcaloid benzilisochinolinic cu efect antibacterian obţinut de la *Coptis japonica*, a cărui sinteză s-a realizat la scară comercială şi în culturi de celule, ceea ce a permis investigarea sistemului enzimatic reglator. Procesul biosintetic care porneşte de la L –tirosină până la berberină cuprinde 13 reacţii enzimatice diferite care implică norcoclaurin-sintaza, N-metiltransferaze, O-metiltransferaze, hidroxilaze, tetrahidro protoberberin-oxidaze, etc. (Figura 7.13).

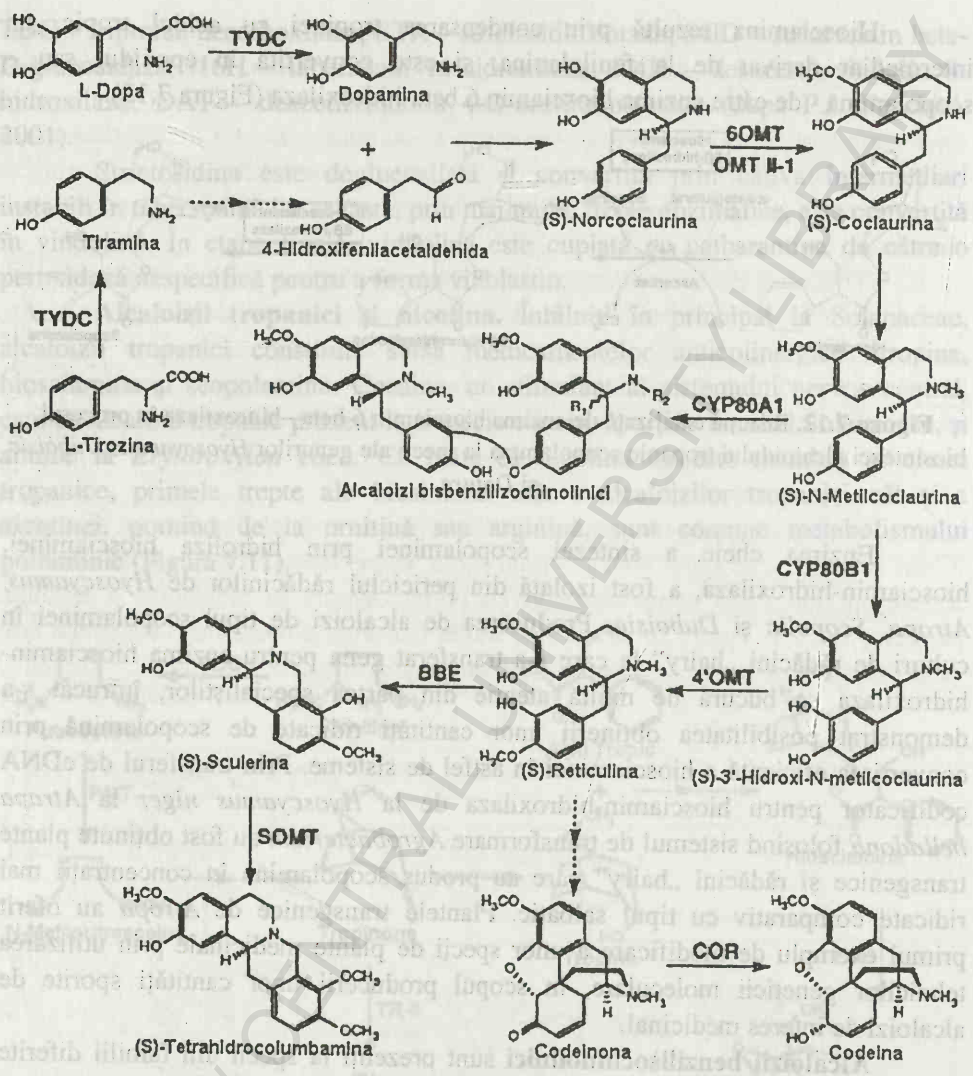


Figura 7.13. Reacţii catalizate de enzime implicate în biosinteza alcaloizilor benzilisochinolinici.

TYDC, tirosin/dopa decarboxilaza, OMT, norcoclaurin 6-O-metiltransferaza, 4'OMT, 3'-hidroxi-N-metilcoclaurin 4'-O-metiltransferaza, OMT II-1, O-metiltransferazaII-1, CYP80A1, berbamunin-sintaza, CYP80B1, (S)-N-metilcoclaurin3'hidroxilaza, BBE, enzima berberin „bridge"; SOMT, sculerin N-metiltransferaza, COR. Codeinon reductaza.

Biosinteza alcaloizilor benzilisochinolinici începe cu o serie de decarboxilări şi dezaminări menite să convertească tirosina în dopamină şi 4-hidroxyfenilacetaldehidă. Singura enzima implicată în aceste faze timpurii ale biosintezei este TYDC, care la *Papaver somniferum* este codificată de aproximativ 15 gene, care codifică pentru isoforme ale enzimei, cu diverse roluri metabolice.

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dopamina şi 4-hidroxifenilacetaldehida sunt condensate de către norcoclaurin-sintaza (NCS) şi dau naştere alcaloidului (S)-norcoclaurine, care este precursorul central al tuturor alcaloizilor bensilisochinolinici. Reacţiile enzimatice care urmează conduc în final la formarea codeinei, care este demetilată şi rezultă morfina.

Majoritatea enzimelor implicate în biosinteza alcaloizilor se află în alte compartimente celulare decât citosolul şi prin compartimentarea acestor enzime se realizează sechestrarea eficientă a alcaloizilor toxici şi a intermediarilor acestora pentru a nu difuza liber în citosol.

Principalul rol al metaboliţilor secundari este cel de protejare a plantei faţă de factorii de stres din mediul înconjurător, biosinteza lor fiind adesea indusă de factori precum atacul unor patogeni sau rănirea ţesuturilor. Experimental s-a constatat că acumularea multor alcaloizi este indusă de elicitori fungici, ioni ai metalelor grele, radiaţii UV sau şoc osmotic. Totodată unele gene implicate în biosinteza alcaloizilor au servit la modificarea producerii de metaboliţi secundari (Tabel nr.6), iar plantele transgenice înzestrate cu noi activităţi enzimatice au devenit instrumente valoroase pentru studiul metabolismului alcaloizilor.

Între primele succese înregistrate în domeniul ingineriei metabolismului alcaloizilor este de menţionat introducerea transgenei pentru triptofan-decarboxilaza (TDC) în celule de *Catharanthus roseus*, ca urmare a infecţiei plantulelor cu o tulpină oncogenă de *Agrobacterium tumefaciens*. Celulele calusurilor la nivelul cărora s-a exprimat transgena pentru TDC au dovedit o activitate crescută a enzimei şi un conţinut crescut în triptamină.

Tabelul 7.6.

Ingineria metabolică a culturilor de ţesuturi şi a plantelor trangenice folosind gene implicate în biosinteza alcaloizilor (dupa P.J. Facchini, 2001).

Modificarea metabolică	Enzima	Specia transformată	Sursa de gene
Creşterea triptaminei	TDC	*Nicotiana tabacum*	*Catharanthus roseus*
Creşterea tiraminei	TDC	*Nicotiana tabacum*	*Catharanthus roseus*
Creşterea serotoninei	TDC	*Peganum harmala*	*Catharanthus roseus*
Reducerea glucozinolatilor indolici	TDC	*Brassica napus*	*Catharanthus roseus*
Redirecţionarea metabolismului shikimatilor; reducerea fenilalaninei; creşterea susceptibilităţii la boli	TDC	*Solanum tuberosum*	*Catharanthus roseus*
Creşterea triptaminei în ţesutul tumoral	TDC	*Catharanthus roseus*	*Catharanthus roseus*
Creşterea alcaloizilor	TDC;	*Catharanthus*	*Catharanthus*

terpenoid indolici în culturi celulare	STR	*roseus*	*roseus*
Creşterea alcaloizilor chinolinici în culturi de rădăcini	TDC; STR	*Cinchona officinalis*	*Catharanthus roseus*
Producerea de strictosidină când se administrează secologanina exogene	TDC; STR	*Nicotiana tabacum*	*Catharanthus roseus*
Creşterea tiraminei în pereţii celulari; descreşterea digestibilităţii	TYDC	*Brassica napus*	*Papaver somniferum*
Creşterea cadaverinei şi anabasinei	LDC	*Nicotiana tabacum*	*Hafnia alvei*
Creşterea putrescinei şi nicotinei	ODC	*Nicotiana tabacum*	*Saccharomyces cerevisiae*
Creşterea agmatinei	ADC	*Nicotiana tabacum*	*Avena sativa*
Creşterea scopolaminei	H6H	*Atropa belladonna*	*Hyosciamus niger*
Creşterea scopolaminei	H6H	*Hyosciamus muticus*	*Hyoscyamus niger*

Culturile celulare non-tumorigene de *Catharanthus roseus* transformate cu transgena pentru STR1 au demonstrat o creştere de zece ori mai mare a activităţii STR şi au acumulat cantităţi mult mai ridicate de strictosidină şi de alţi alcaloizi terpenoid indolici comparativ cu culturile de tip sălbatic. Culturile celulare stabilite de la plante transgenice de tutun, care exprimau gene de la *Catharanthus roseus* pentru TDC şi STR1, au acumulat triptamina şi au produs strictosidina atunci când s-a adăugat secologanină la mediul de cultură. Aceste rezultate demonstrează că două trepte consecutive ale biosintezei alcaloizilor terpenoid indolici pot să se exprime la o specie care în condiţii normale nu produce aceşti metaboliţi.

Unele dintre primele încercări de inginerie metabolică a produşilor secundari au vizat derivaţii poliaminici. Culturi de rădăcini transgenice de *Nicotiana rustica* în care se exprimă gena ODC de la drojdii, au produs niveluri ridicate de putresceină şi nicotină. Supraexpresia genei pentru enzima ADC de la ovăz la tutun a determinat creşterea acumulării de agmatină. Culturile de rădăcini de tutun transformate cu o genă bacteriană pentru lisin-decarboxilaza (LDC), au produs niveluri ridicate de cadavarină şi de anabasină. Gena pentru H6H de la *Hyoscyamus niger* exprimată constitutiv în plante transgenice de *Atropa belladonn*a a determinat biosinteza unor cantităţi ridicate de scopolamină. Largi variaţii s-au constatat în culturile de rădăcini de la *H. muticus,* specie cu o capacitate ridicată de acumulare a alcaloizilor tropanici, la care expresia genei pentru H6H a condus la unele linii la o creştere de 100 de ori a scopolaminei.

Transferul genei pentru TDC la *Brassica napus* (canola) a avut ca rezultat redirecţionarea triptofanului spre triptamina în loc de glucozinolaţii indolici, astfel

că semințele plantelor transgenice au avut un conținut de glucozinolați de numai 3% din cel al semințelor de tip sălbatic. Întrucât prezența la plantele oleaginoase precum canola a glucozinolaților indolici descreşte valoarea utilizării acestora ca furaje, aceste cercetări constitue un exemplu elegant pentru utilizarea unor gene implicate în biosinteza alcaloizilor care pot schimba direcția fluxului metabolic pentru a reduce biosinteza unor compuşi care nu sunt de dorit din punct de vedere practic.

Alcaloizii sunt importanți nu numai pentru efectul lor asupra fiziologiei oamenilor şi animalelor, dar s-a constatat că şi în lumea plantelor alcaloizii au funcții ecochimice importante, intervenind în reacțiile de apărare ale plantelor împotriva unor patogeni, împotriva animalelor ierbivore sau constituie pro-toxine pentru insecte, acestea încorporându-le în propriile secreții de apărare.

Exploatarea potențialului biotehnologic al biosintezei alcaloizilor este abia la început, dar cu toate acestea au fost deja clonate gene implicate în procesele biosintetice ale unor alcaloizi importanți, iar acumularea de noi date din domeniul biochimiei, biologiei moleculare şi biologiei celulare vor crea noi oportunități pentru ingineria metabolică a plantelor transgenice (T.M. Kutchan, 1995, P.J. Facchini, 2001).

7.2.2.3. Plantele transgenice ca uzine biofarmaceutice

Ingineria genetică a revoluționat practica agronomică prin obținerea plantelor transgenice ca rezultat al creării unor noi combinații de gene care nu se pot realiza în condiții naturale. Plantele transformate din „primul val" al agribiotehnologiei au căpătat noi însuşiri în special privind rezistența la dăunători, ca de exemplu „porumbul Bt" şi „bumbacul Bt" la care s-au transferat gene de la *Bacillus thuringiensis* pentru proteine specifice toxice pentru insectele dăunătoare, sau gene care conferă plantelor transformate capacitatea de rezistență la unele erbicide cum este glyphosate (de exemplu „soia Roundup Ready"). Obținerea de plante cu noi caracteristici menite să sporească eficiența agronomică (tomate tolerante la sărăturare) sau cu calități nutritive superioare (porumb cu un conținut ridicat în lisină) a constituit obiectivul central al altor generații de plante transgenice. În prezent cercetarea agribiotehnologică se află pe creasta unui alt „val" al transgenezei, căruia i s-a mai atribuit şi numele pretențios de „agricultura moleculară", pe considerentul că aceasta îşi propune cultivarea plantelor nu în scopurile tradiționale de producere de alimente, fibre sau furaje, ci pentru valorificarea unor biomeolecule utile în domeniul medical sau industrial. Produsele primare ale agriculturii moleculare sunt de regulă proteine cu diferite funcții, produse în plante, incluzând imunoglobuline (anticorpi), antigeni, enzime şi proteine structurale (Tabelul 7.7). Produsele derivate sunt în cea mai mare parte compuşi non-proteici, sinteza acestora depinzind de prezența în organismul vegetal a sistemelor enzimatice corespunzătoare pentru a completa procesele metabolice (A.Felsot, 2002).

Tabelul 7.7.

Produse primare (prot.) si derivate ale agriculturii moleculare

Produse primare	Produse derivate
Anticorpi (imunoglobuline)	Bio-plastice
Enzime (utilizate în industrie, terapeutică, diagnostic, cosmetică)	Vitamine, co-factori
Proteine structurale (peptide, hormoni)	Nutraceutice
Antigeni (vaccinuri)	Metaboliți secundari (fenoli, glucosinolați, taninuri, amidon, arome, parfumuri, alcaloizi)

Încă din faza de început a tehnologiei transgenice s-au conturat direcții de cercetare care şi-au propus utilizarea unor promotori constitutivi puternici capabili să determine exprimarea unor proteine straine în specii vegetale. În unele cazuri însă s-a constatat că expresia proteinelor străine constitue o încărcătură prea mare pentru metabolismul speciei gazdă, care afectează chiar viabilitatea agronomica a acesteia. Ca urmare s-a ajuns la concluzia că exprimarea proteinelor străine la nivelul unor organe specifice, precum frunzele sau semințele este preferabilă supraexpresiei generalizate. Două strategii s-au evidențiat prin potențialul valorificării la scară comercială a acestor abordări.

Un prim succes a vizat exprimarea proteinelor străine în semințele plantelor oleaginoase transgenice, ca urmare a fuziunii proteinelor heteroloage cu oleosinele proprii plantei gazdă. Oleosinele sunt proteine care învelesc corpii lipidici pe măsură ce semințele se maturizează, şi ca urmare a fuziunii proteinelor heteroloage cu oleosinele, acestea se acumulează la suprafața corpilor lipidici. După recoltarea semințelor, corpii lipidici sunt separați de restul materialului vegetal, rezultând o fracțiune constând aproape exclusiv din ulei şi din proteină recombinantă fuzionată. Proteina heteroloagă este apoi separată de proteina oleosinica purtătoare în cantități importante, drept care această tehnică este în mod curent utilizată în Canada pentru producerea comercială a unor proteine biofarmaceutice anticoagulante.

Transformarea genetică pentru producerea de proteine terapeutice s-a realizat deja la multe specii (*Nicotiana tabacum, Nicotiana bethamiana, Arabidopsis thaliana,* tomate, banane, ridichi, rapiță, muştar, cartof, orez,, grâu , porumb) folosind sistemul *Agrobacterium,* metoda biolistică sau alte tehnici standard de transformare.

O a doua abordare implică utilizarea vectorilor virali pentru expresia proteinelor straine în plante. În acest caz planta nu trebuie să fie transgenică, ci se inoculează cu virusuri recombinante care poartă transgene incluse în genomul lor, transgene care se exprimă în timpul replicării virusului în organismul vegetal. Plantele gazdă sunt cultivate până atunci când titrul proteinelor recombinante atinge un nivel corespunzător, această tehnică fiind utilizată cu succes pentru producerea de proteine-vaccin.

Față de sistemele convenționale de producere a proteinelor terapeutice, constând din culturi de celule animale, de bacterii sau de fungi, producerea comercială a proteinelor terapeutice în plante oferă multe beneficii economice şi

calitative, între care se remarcă reducerea riscurilor pentru sănătate create de contaminarea cu patogeni specifici omului sau animalelor şi productivitatea ridicată.

În timp ce biofarmaceuticele produse în sisteme de culturi celulare trebuie să fie purificate din supernatant, proces care cere costuri ridicate, aceleaşi produse pot fi stocate în endospermul semințelor plantelor transgenice, de unde pot fi extrase cu usurință. Procesul de purificare nici nu este întotdeauna necesar, cum este cazul vaccinurilor comestibile. În plus, pentru cultivarea, recoltarea, depozitarea şi procesarea plantelor transgenice există deja infrastructura agriculturii convenționale, astfel că noile investiții de capital nu sunt ridicate, iar o parte dintre costuri sunt acoperite prin obținerea unor produse de bază de tipul uleiurilor, amidonului, etc., concomitent cu compuşii biofarmaceutici.

În consecință, s-a constatat că proteinele recombinante sunt produse la costuri de 10–50 de ori mai reduse comparativ cu producerea aceleiaşi proteine în *Escherichia coli* (G. Giddins şi colab., 2000).

Pe baza unor epitopi peptidici ai patogenilor, plantele au fost modificate pentru a produce vaccinuri împotriva multor boli umane şi animale (Tabel nr.8). Testele clinice realizate de compania biofarmaceutică ProdiGene au demonstrat că în urma hrănirii porcilor cu un vaccin comestibil exprimat în boabele de porumb, animalele sunt protejate de virusul transmisibil al gastroenteritei. Eforturi susținute se fac în scopul obținerii unor vaccinuri eficiente pentru prevenirea infecțiilor cu virusul hepatitei B. Încă din 1995 au fost obținute plante transgenice de tutun şi de cartof în țesuturile cărora se exprimă antigenul de suprafață (HbsAg) pentru hepatita B. Vaccinurile produse în banane vizează prevenirea unor boli precum pojarul, poliomielita, difteria, febra galbena, şi anumite tipuri de diaree virală.

Tabelul 7.8.

Producerea de vaccinuri în plante (dupa G. Giddings, 2000)

Aplicații potențiale	Specia vegetală	Proteina	Sistemele de expresie
Hepatita B	tutun	HBsAg recombinantă	AMT
	tutun	Epitopul hepatitei murine	TMV
Carii dentare	tutun	Proteina de suprafață *SpaA* de la *Streptococcus mutans*	AMT
Diabet autoimun	cartof	Subunitatea B a toxinei de la *Vibrio cholerae* fuzionata cu insulina umană	ăAMT
	cartof	Acid glutamic-decarbaxilaza	AMT
Holera şi diareea	cartof/ tutun	Enterotoxina LT-B de la *Escherichia coli*	AMT
Holera	cartof	Subunitățile CtoxA şi CtoxB ale toxinei de la *V. Cholerae*	AMT
Diareea	cartof/ tutun	Proteina capsidei virusului Norwalk	AMT
Turbarea	tutun/	Glicoproteina virusului	AMT

	spanac	turbării	
HIV	tutun/ măzăriche	Epitopul HIV (gp120) Epitopul HIV (gp 41)	CPMV/AMT CPMV
Rhinovirusuri	mazariche	Epitopul rhinovirusului uman (HR14)	CPMV
Enterite animale	măzăriche	Epitopul virusului enteritei (VP2)	CPMV
Malaria	tutun	Epitopul celulelor-B	TMV
Influenza	tutun	Hemaglutinina	TMV

AMT – transformare mediata de *Agrobacterium tumefaciens*
TMV - Virusul mozaicului tutunului
CPMV – Virusul mozaicului mazarichei (*Vigna sinensis*).

Cu toate că potențialul terapeutic al anticorpilor este de multă vreme recunoscut prin asigurarea unei protecții pe termen scurt împotriva unor agenți infecțioşi, utilizarea clinică a acestora este limitată de unele dificultăți în producerea lor. În 1989 s-a demonstrat că pot fi produşi anticorpi funcționali, numiți şi „planticorpi", în plante transgenice, care să fie folosiți în terapeutica umană şi animală (Tabelul 7.9). Anticorpii recombinanți pot fi directionați să se acumuleze în anumite organe ca de exemplu în semințe sau în tuberculi, fapt ce facilitează depozitarea, transportul şi administrarea acestora.

Tabelul 7.9.

Producerea de anticorpi în plante transgenice.

Scopul	Specia	Proteina	Sistem transform.
Imunoglobuline anti - carii dentare	tutun	*slgA-G* hibrida specifică pt. antigenul II de la *S.mutans*	AMT
Sinteza de IgG1	tutun	*IgG* specifică pentru proteina de suprafață SA I/II de la *S. mutans*	AMT
Acumularea de proteine de rezervă în tuberculi	cartof	*scFv*-legată la fitocromi	AMT
Tratamentul limfomului Hodgkin	tutun	*scFv* ale *IgG* de la celulele-B din limfoamele de şoarece	AMT
Markeri antigenici asociați cu tumori	cereale	*scFvT84.66* împotriva antigenului carcinoembriogenic	Biolistic

AMT – transformare mediată de *Agrobacterium tumefaciens.*

Avantajul principal pe care îl prezintă plantele transgenice producătoare de anticorpi față de sistemele bacteriene de expresie constă în posibilitatea asamblării anticorpilor complecşi în plante supuse la mai multe încrucişări sexuate, pentru cumularea genelor la descendenţi („gene stacking"). La tutun s-au obţinut transgenicilor quadrupli, la nivelul cărora s-a realizat asamblarea eficientă a imunoglobulinei secretoare A (*sIgA*).

O serie de alte proteine importante din categoria anticoagulanţilor, a inhibitorilor proteici, a enzimelor recombinante şi a nutraceuticelor se exprimă în plante transgenice, ca de exemplu enkephaline, alfa-interferon, albumine de ser uman, şi două dintre cele mai scumpe medicamente: glucocerebrosidaza şi factorul de stimulare a granulocit-macrofagelor. Este bine-cunoscut exemplul producerii în plante transgenice ca tutunul, mustarul şi rapiţa a anticoagulantului hirudin, izolat anterior din lipitori – *Hirudo medicinalis* – şi utilizat pentru tratamentul trombozelor. Metoda biotehnologică asigură ca hirudina să se acumuleze în seminţe şi să devină activă numai după recoltare, fapt ce limitează impactul asupra mediului înconjurător, astfel că în prezent rapiţa transgenică pentru producerea de hirudină este cultivată la scară comercială în Canada. Enzime precum lipazele necesare în tratamentul fibrozei cistice şi pancreatitei cronice sunt de asemenea produse la scară comercială de firma Meristem Therapeutics în boabele de porumb transgenic, iar lista companiilor biotehnologice angajate în astfel de cercetări creşte în permanenţă (Tabelul 7.10).

Tabelul 7.10.

Companii biotehnologice care experimentează producerea de fitofarmaceutice recombinante.

Compania	Specia/produsul
AltaGen Bioscience	Frunze cartof: proteine sanguine, vaccinuri
Crop Tech	Frunze tutun: vaccin HIV, enzime
Epicyte Pharmaceuticals	Boabe porumb, orez: anticorpi monoclonali
Large Scale Biology	Frunze tutun: anticorpi monoclonali
Medicago	Frunze lucernă: interferon, anticorpi monoclonali
Prodigene	Boabe porumb: enzime, vaccinuri
SemBiosys Genetics	Seminţe oleaginoase: anticoagulanţi, anticorpi
Monsanto	Porumb: produse antitumorale, anticorpi

Fără îndoială că biofarmaceuticele derivate de la plantele transgenice trebuie să îndeplinească toate standardele de performanţă şi de siguranţă impuse produselor similare derivate din sisteme non-transgenice, iar prevenirea contaminării mediului înconjurător trebuie să fie garantată (G. Giddins şi colab., 2000).

7.2.2.4. Plantele transgenice – beneficii şi riscuri.

Asigurarea necesarului de produse alimentare pentru populaţia globului se bazează în primul rând pe producţia vegetală. Schimbarea caracteristicilor principalelor specii cultivate pentru sporirea productivităţii şi a profitului i-a preocupat dintotdeauna pe cultivatori şi ca urmare agricultura a devenit un agent major al modificărilor mediului înconjurător, în condiţiile în care areale extinse ale ecosistemelor naturale au fost convertite în exploataţii agricole. Consecutiv cu îngrijorarea conturată la nivel global în legatură cu aceste schimbări, s-a impus conceptul de dezvoltare durabilă, în scopul reducerii consecinţelor negative de ordin economic produse de gestionarea greşita a ecosistemelor naturale şi a celor agricole.

Analizele privind perspectivele dezvoltării civilizaţiei în acest nou mileniu au evidenţiat fără excepţii faptul că în condiţiile unei populaţii estimate la 12 miliarde până în anul 2050, producţia de alimente va trebui să fie triplată faţă de nivel actual. Cererea crescândă de produse alimentare va trebui rezolvată în conditiile în care suprafeţele arabile nu mai pot fi extinse semnificativ, când aproximativ o treime din producţia agricola se pierde datorită bolilor şi dăunătorilor şi când utilizarea largă a agro-chimicalelor produce poluarea gravă a solului şi a apei. În consecinţă, creşterea producţiei de produse alimentare nu se va putea realiza decât prin creşterea productivităţii pe suprafeţele cultivate în prezent, dar cu mai putină apă şi în condiţii de mediu tot mai aspre (I.K. Vasil, 2003).

Biotehnologia vegetală şi-a demonstrat pe deplin potenţialul mai ales în ultimul deceniu, când, ca urmare a transferului şi integrării stabile a unor gene străine în genomul celulelor cultivate „in vitro", au fost regenerate plante fertile de la celulele transformate şi s-au realizat primele culturi de plante transgenice la scară comercială.

Plantele transgenice din prima generaţie au fost înzestrate cu însuşiri de rezistenţă la erbicide (soia, canola), la insecte (bumbac, porumb) şi virusuri (papaia, dovlecel). Prin eliminarea sau prin reducerea semnificativă a pierderilor cauzate de buruieni, de boli şi de dăunători, culturile transgenice s-au remarcat prin producţii superioare, contribuind totodată la conservarea solului, a apei, energiei şi a altor resurse.

Suprafeţele cultivate cu plante transgenice au crescut semnificativ, de la 2 milioane hectare în 1996 la 80 milioane hectare în 2003, iar piaţa totală a semînţelor transgenice depăşeşte 3 miliarde dolari.

Prin urmare biotehnologia vegetală nu mai este o ştiinţă abstractă, care prezintă numai promisiuni şi potenţiale, ci se dovedeşte a fi o tehnologie agricolă puternică de creştere a productivităţii, cu impact pozitiv atât asupra sănătăţii oamenilor şi a mediului cât şi asupra conservării biodiversităţii, a terenului arabil, a apei şi a resurselor energetice.

Numeroase gene utile au fost introduse în ultimii ani în genomurile speciilor de plante cultivate pentru alimente sau pentru fibre, în scopul îmbunătăţirii calităţii, a valorii nutriţionale şi a rezistenţei la diverşi factori abiotici şi biotici de stres. Peste 50 de astfel de specii de plante transgenice au fost aprobate

pentru cultivare la scara comercială, iar alte 100 de specii se află în faza de testare în câmp. Se prevede ca aceasta a doua generație de plante transgenice (Tabelul 7.11) să fie introduse pentru producție comercială în următorii 10 ani.

Tabelul 7.11.

A doua generație de plante transgenice: 2005- 2015

- rezistență la erbicide, dăunători și patogeni;
- toleranță la secetă, sărăturare, metale grele și extreme termice;
- îmbunătățirea calității nutriționale (proteine, lipide, vitamine, minerale;
- îmbunătățirea aromelor și a parfumurilor;
- eliminarea alergenilor;
- producerea de vaccinuri, proteine umane terapeutice, compuși farmaceutici;
- fitoremediere

Agricultura moleculară sau producerea dirijată de compuși biofarmaceutici în plante constituie unul dintre cele mai promițătoare domenii de cercetare, care utilizează plantele transgenice pentru producerea de vaccinuri, proteine profilactice și terapeutice și alți compuși biofarmaceutici importanți, cum sunt cei pentru tratarea fibrozei cistice, hepatitei B, limfomului non-Hodgkin, diareei, holerei, diabetului și a altor boli. În cea mai mare parte aceste medicamente și vaccinuri sunt produse în mod curent în porumb, tutun, cartof, tomate sau în banane și se află în diferite stadii ale testărilor clinice.

Progresele rapide înregistrate în secvențierea genomurilor vegetale și în înțelegerea structurii, funcției și reglării genice au contribuit foarte mult la înțelegerea bazelor moleculare ale creșterii și dezvoltării plantelor. Secvențierea genomului la *Arabidopsis thaliana* și la orez s-a încheiat, iar pentru *Lotus, Brassica, Medicago,* porumb, orz, grâu, tomate, cartof, soia și pin se află în diferite stadii ale secvențierii.

Majoritatea plantelor cultivate au atins deja limitele fiziologice ale productivității, astfel că prin metodele ameliorării convenționale producțiile nu mai pot fi crescute semnificativ. Ca urmare este așteptată cu interes cea de a treia generație de plante transgenice (Tabelul 7.12), mai productive și mai bine adaptate la stres abiotic și biotic. Totodată produsele alimentare transgenice vor fi mai nutritive și mai sănătoase, iar o gama largă de compuși farmaceutici vor fi disponibili dupa 2015 pentru utilizare în terapeutica umană și veterinară.

Tabelul 7.12

A 3-a generație de plante transgenice

- modificarea arhitecturii plantei;
- cotrolarea momentului înfloririi;
- manipularea calității fructelor și a semințelor, a dimensiunii și a numărului acestora;
- creșterea eficienței fotosintezei;
- ameliorarea asimilării nutrienților;
- exploatarea și manipularea heterozisului și a apomixiei

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI CHIMIE

În mare parte oamenii de știință consideră transgeneza ca fiind precisă, previzibilă și sigură. Plantele transgenice sunt printre cele mai exhaustiv testate, caracterizate și reglementate produse din istoria ameliorării, pentru a se demonstra că acestea și produsele lor sunt cel puțin la fel de sigure pentru oameni și mediu ca și plantele care sunt rezultatul ameliorării convenționale. De altfel, după unele opinii, încrucișarea și selecția practicate pe parcursul secolelor, au condus la modificarea pronunțată a structurii genetice a plantelor, astfel că aproape toate speciile de plante cultivate ar trebui să fie considerate „modificate genetic". Cu toate acestea se consideră că prudența este necesară pentru a elimina riscul a ceea ce oponenții tehnologiei transgenice numesc „efectele neintenționate" asupra altor organisme și asupra mediului înconjurător. Dezvoltarea transgenezei a generat polemici aprinse în care s-au angajat deopotrivă oameni de știință, politicieni, oameni de afaceri, jurnaliști, organizații ne-guvernamentale și publicul larg. Spre deosebire de ameliorarea convențională, metodele biotehnologice permit transferul de gene între specii care nu pot fi hibridate datorită barierelor naturale ale incompatibilității sexuate, acesta fiind principalul argument al opozanților care percep instrumentele ingineriei genetice ca fiind „nenaturale". Există teama că această interferență nenaturală în constituția genetică a speciilor ar putea în primul rând avea consecințe nedorite pentru sănătatea oamenilor, care nu mai acceptă automat faptul că orice progres științific este neaparat benefic pentru umanitate. Multă îngrijorare este generată de driftul genic de la plantele transgenice la cele netransgenice, apariția de insecte tolerante la proteinele cu efect insecticid sintetizate de plantele transformate, apariția de microbi toleranți la mecanismele de rezistență ale plantelor transformate cu gene unice de rezistență, și îngustarea bazei genetice a plantelor cultivate prin reducerea numărului de varietăți comerciale. Tehnologia transgenică ideală trebuie sa fie fezabilă din punct de vedere comercial, să fie benignă pentru mediul înconjurător și ușor de utilizat în diferite agroecosisteme.

Fără a fi ignorate implicațiile etice și sociale ale manipulării genelor, prin tratarea acestor implicații într-o manieră deschisă, științifică și responsabilă, se estimează că în viitorul apropiat biotehnologiile vor deveni pretutindeni o componentă de rutină a sistemelor agricole din multe țări, iar ceea ce numim „revoluția genică" va deveni elementul central al dezvoltării durabile.

8. INGINERIA GENETICĂ A HALOTOLERANȚEI LA PLANTE

8.1. MECANISMUL TOLERANȚEI LA STRESUL SALIN ÎN PLANTE ŞI MICROORGANISME

Celulele, dar şi organismele multicelulare au dezvoltat în cursul evoluției lor mecanisme de toleranță şi adaptare la schimbările dramatice ale mediului înconjurător, care au permis supraviețuirea în noile condiții sau au asigurat ocuparea unei noi nişe ecologice. Aceste circumstanțe nevaforabile, care afectează creşterea celulară sunt denumite generic cu termenul de stres şi sunt foarte diferite. Sunt incluse în această categorie modificările de mediu (şocul termic, osmostresul, stresul determinat de valorile extreme de pH), prezența unor substanțe stresante în mediu (stresul salin, stresul generat de metalele grele, stresul la etanol etc.), stresul oxidativ sau limitarea concentrației de nutrienți (Mayer, 1998).

Stresul salin (stresul sării, halostresul) este produs de prezența unor concentrații mari de săruri în mediu, în special de clorură de sodiu şi are la bază două componente:

- stresul osmotic (osmostresul, şocul osmotic, deshidratarea osmotică) determinat de scăderea disponibilităților de apă (stresul apei) şi modificarea osmolarității mediului, este cuantificat prin activitatea apei (A_w);
- stresul provocat de toxicitatea ionilor, care este evaluat prin determinarea salinității mediului.

Stresul sării reprezintă principalul stres abiotic la plante şi afectează în prezent peste 20% din terenul agricol şi 50% din suprafețele pe care se cresc plante de cultură, conform unui raport din anul 2002 al Națiunilor Unite în cadrul programului pentru mediul înconjurător "The United Nations Environment Program" (Yokoi, S., 2002). Managementul defectuos al apei şi solului au facilitat apariția şi evoluția acestui proces, care a devenit în ultimii ani o amenințare serioasă în agricultură deoarece plantele de cultură sunt cele mai sensibile la efectele negative ale sării iar productivitatea lor este profund afectată.

8.1.1. Halotoleranța - strategia compușilor osmoreglatori și homeostazia ionilor

Toleranța la stresul salin (halotoleranța) este definită prin capacitatea celulelor de a supraviețui la stresul apei, a se adapta la modificările în osmolaritatea mediului și a continua creșterea și dezvoltarea pe mediul salin. Această noțiune este frecvent asociată cu comportamentul microorganismelor care tolerează stresul sării - halotolerante, în timp ce la plante se preferă utilizarea termenului de rezistență la sare care are o conotație mai largă și se referă atât la toleranță, cât și la mecanismul de evitare a stresului salin prezent la unele glicofite [4]. Haloadaptarea este întâlnită la microorganismele halofile extreme și plantele halofite iar strategiile care o asigură sunt complet diferite (de exemplu, strategia bacteriană "salt-in", adaptările morfologice speciale de la halofite).

În lumea vie mecanismul toleranței la stresul clorurii de sodiu se bazează pe două strategii generate și dependente de cele două efecte ale stresului: strategia compușilor osmoreglatori (strategia "compatible solute") pentru a păstra balanța osmotică intracelulară și homeostazia ionilor pentru a contracara toxicitatea Na^+ și Cl^-. Ambele au un rol crucial, dar contribuția fiecăreia la asigurarea toleranței variază considerabil în diferite organisme. În plus, s-a constatat că diferențele existente între specii în ce privește halotoleranța sunt determinate de fapt de eficiența cu care se aplică aceste strategii.

Strategia "compatible solute", identificată la microorganisme halofile moderate și halotolerante, dar și la plante și animale, se bazează pe acumularea unor compuși organici, non-toxici numiți osmoreglatori/osmoliți, care stabilizează proteinele și structurile celulare și cresc presiunea osmotică în celulă. Astfel se asigură funcționarea proteinelor intracelulare sau a altor structuri membranare fără să fie necesară o adaptare specială a lor, comparativ cu strategia "salt-in", unde componentele celulare și proteinele (haloproteine) prezintă adaptări moleculare unice, care le permit funcționarea în medii cu concentrații ridicate de cloruri (intracelular KCl, extracelular NaCl).

Compușii cu rol osmoreglator sunt fie sintetizați de celule, fie sunt preluați din mediul extern, caz în care sunt denumiți compuși osmoprotectori (de exemplu, prolina și betaina). In celulă osmoliții au rol dublu, intervenind în răspunsul la stres dar pot fi folosiți și cu alte scopuri, de exemplu în calitate de sursă de carbon și energie. Din punct de vedere structural compușii osmoreglatori și osmoprotectori prezintă o mare diversitate (tabelul 8.1), iar lista de substanțe cunoscute crește permanent. Din punct de vedere chimic sunt compuși organici cu greutate moleculară mică (majoritatea), solubili la concentrații mari în apă și care la pH fizilogic nu sunt încărcați electric sau au o încărcătură zwitterionică. Ei au fost identificați relativ recent, folosind tehnici ca ^{13}C-NMR și cromatografia lichidă la presiune înaltă, dar solubilitarea și modul lor de acțiune nu sunt (încă) elucidate pe deplin.

Tabelul 8.1.

Compuşi osmoreglatori şi osmoprotectori

Tipul de compus	*Exemple*
Poli-hidroxi alcooli	Glicerol, arabitol, eritriol, sorbitol, xilitol, glicol, manitol
Glucide sau derivații lor	Glucoză, zaharoză, trehaloză şi 2-sulfotrehaloză, glicozil-glicerol
Aminoacizi	Glutamat, prolină, alanină, N-acetilornitină, N-acetillizină
Amine cuaternare	Glicin-betaină/trimetilglicină, ectoină şi hidroxiectoină
Alți compuși	Dimetilsulfonium propionat

Osmoliții sunt întâlniți în toate domeniile vieții (*Archaea, Bacteria* şi *Eucarya*), unii fiind specifici - apar doar într-un anumit domeniu/la anumite specii, spre exemplu: unele animale utilizează ureea şi trimetilamin-N-oxidul cu rol osmoreglator, N-ε-acetilisina şi N-δ-acetilornitina sunt sintetizate doar de bacteriile Gram-pozitive, glutamatul este prezent mai ales în bacteriile Gram-negative iar prolina la Gram-pozitive. În timp ce alți osmoliți sunt nespecifici şi se întâlnesc atât la microorganisme cât şi la plante: trehaloza, sucroză, glicerol, sorbitol, manitol, glicin-betaina, prolină şi glutamat. Prezența compuşilor cu rol osmoreglator în majoritatea organismelor (microorganisme, plante şi animale) supuse unui stres salin este un exemplu edificator de evoluție convergentă.

La microorganisme producerea osmoliților este specie specifică, dar depinde şi de tipul celular ori de faza de dezvoltare a populației. Distribuția lor cantitativă şi calitativă în celulă diferă de la o specie la alta, fiind de asemenea corelată cu intensitatea şi durata stresului, natura constituenților din mediu, nivelul sursei de azot etc. Germenii halofili moderați şi halotoleranți conțin în general un "cocktail" de compuşi activi osmotic, amestec ce permite reglarea separată a fiecărui răspuns pe care celula microbiană îl are față de condițiile mediului înconjurător (tabelul 8.2). Deoarece consumul energetic este diferit pentru producerea diverselor molecule osmoreglatoare şi unii osmoliți par mai eficienți ca alții în activitatea lor de stabilizator al structurii şi activității unei proteine, celulele sintetizează compuşi în cantități diferite sau tipuri diferite de osmoliți, în funcție de nivelul stresului salin. Astfel, bacteria halofilă moderată *Halomonas israeliensis* conține pe mediul cu 0,6 M NaCl trehaloză, cu rol de principal compus osmoreglator, în timp ce la concentrații mai mari de sare ectoina devine majoritară iar levurile din genul *Saccharomyces* sp. produc glicerol în condiții de stres salin moderat şi trehaloză la stresul sever.

Tabelul 8.2.

Compuşi organici osmoreglatori la microorganismele halotolerante

Microorganism	*Prolina*	*Glutamat*	*Glicerol*	*Trehaloză*	*Alţi compuşi*
Escherichia coli		++		++	Trimetilglicina
Pseudomonas sp.		+			Manitol, glicozilglicerol
Rhizobium sp.	++	+			
Saccharomyces cerevisiae			++	++	Manitol, arabitol, eritriol, sorbitol, xilitol
Debaryomyces hansenii			++		
Zygosaccharomyces rouxii			++		
Candida tropicalis			++		
Pichia sorbitophila			++		
Aspergillus nidulans			+	++	
Dunalliela sp.			++		

Plantele glicofite acumulează mai ales zaharoză, prolina şi betaina, dar unele specii utilizează şi alte substanţe organice, ca de exemplu: trehaloză, rafinoză, fructan, glucoză, fructoză, manitol, sorbitol, pinitol, ononitol, glicerol, inozitoli metilaţi, β-alanin betaina, trimetilglicina, prolin-betaina, amine terţiare, dimetil sulfonium propionatul, colin *o*-sulfatul sau ioni organici (anionul malat, ionul acid oxalat) şi anorganici (K^+). Nivelul la care plantele sunt capabile să tolereze salinitatea nu este corelat doar cu cantitatea intracelulară de osmoliţi, mecanismul fiind mult mai complex şi sunt implicate capacitatea de a compartimenta ioni, toleranţa la stresul oxidativ etc. În plus, plantele prezintă mecanisme metabolice care limitează nivelul de osmoliţi ce se acumulează intracelular (maxim 0,4 M osmoliţi).

Homeostazia ionilor se bazează pe menţinerea unui raport intracelular constant între cationii de sodiu şi potasiu prin transportul ionilor, eliminarea şi/sau compartimentarea ionilor de sodiu şi clor în vacuole la eucariote (cu specificaţia că la plante ambii ioni sunt toxici iar la drojdii doar Na^+). Adaptarea pe termen lung la sare este strict dependentă de menţinerea unui raport intracelular Na^+/K^+ într-un domeniu care să asigure funcţionarea optimă a organitelor şi membranelor celulare.

La drojdii, transportul ionilor este esenţial şi se realizează prin intermediul unui sistem de influx-eflux prin membrana plasmatică, care asigură homeostazia cationilor şi include diferite proteine (H^+-ATPaza, ATP-aza de transport a sodiului Ena 1p, proteinele Na^+/H^+ antiport Nha 1p şi Nhx 1p, transportori de potasiu Trk 1/2p şi alte canale ionice).

Celulele vegetale au adoptat diverse mecanisme pentru a evita efectele toxice ale ionilor de sodiu şi clor, care se bazează fie pe includerea şi compartimentarea ionilor, excluderea lor, pe capacitatea plantei de a restricționa pătrunderea ionilor în celulele rădăcinii ori pe creşterea acumulării de potasiu şi scăderea influxului de sodiu. Astfel, unele specii de plante transportă şi compartimentează ionii toxici în vacuole şi devin mai suculente, altele posedă glande speciale pe suprafața frunzei care asigură eliminarea excesului de sare (unele halofite), în timp ce alte specii pot exclude Na^+ ori Cl^-, sau ambii ioni. Chiar şi plantele sensibile la salinitate acumulează ionii în vacuole, în timp ce halofitele ajung până la o concentrație vacuolară de 1M NaCl.

La microorganisme şi plante acumularea ionilor de sodiu şi clor în vacuole, respectiv strategia "salt-in" sunt variante ieftine bioenergetic pentru a asigura toleranța la sare iar sinteza osmoliților reprezintă alternativa costisitoare. Cu toate acestea, acumularea compuşilor osmoreglatori constituie principalul component al strategiei utilizate de plantele non-halofite şi microorganisme în procesul de halotoleranță. Aceasta s-a dovedit a fi în cursul evoluției o strategie de succes datorită flexibilității sale, care asigură o mare adaptabilitate a celulei la schimbările în concentrația de sare a mediului exterior şi permite supraviețuirea organismelor atât în medii normale, cât şi în medii cu activități reduse ale apei.

8.1.2. Răspunsul biologic la stresul salin

Halotoleranța este un proces complex şi aditiv, o funcție a unui răspuns pe termen scurt care asigură supraviețuirea la şocul hiperosmotic şi un răspuns adaptativ de lungă durată în care mecanismele funcționează continuu (în special osmoreglarea şi homeostazia ionilor), se reîncepe procesul de creştere şi diviziune celulară şi pot apărea în mod spontan mutante cu toleranță mărită la stresul salin [10]. Răspunsul biologic la halostres este complex şi acționează prin inițierea activității a numeroase mecanisme intracelulare care pot genera în timp schimbări la nivel celular, fiziologic şi în dezvoltarea organismelor.

Răspunsul celulei microbiene şi a celei vegetale la stresul sării este de două tipuri:

1. un răspuns general la stres;
2. un răspuns specific la stresul salin, care conține două componente:

– componenta osmotică nespecifică, inițiată de pierderea rapidă a apei intracelulare;

– componenta toxică specifică, generată de activitatea totală a ionilor şi proporția lor relativă în mediu, toxicitate care produce efecte adverse considerabile asupra diferitelor sisteme celulare.

1. Expresia "general stress response" evidențiază cu claritate faptul că celulele posedă capacitatea de a iniția un răspuns general şi rapid la orice circumstanță nefavorabilă care le afectează creşterea şi/sau dezvoltarea. În cadrul răspunsului general la stres celulele exprima un set specific de gene care sunt implicate în protejarea celulei sau permit repararea stricăciunilor provocate de inducerea stresului (sinteza trehalozei, răspunsul la stresul oxidativ asociat halostresului, exprimarea genelor care repară ADN etc.).

2. Răspunsul specific la stresul salin declanşează mecanismele biologice celulare implicate în NaCl-osmoreglare, homeostazia ionilor, reajustarea specifică a structurii peretelui celular, care reduc creşterea şi stopează diviziunea celulară pentru o perioadă de timp etc. La drojdiile osmotolerante, respectiv plantele halofite se consideră că acest tip de răspuns este mai bine controlat şi mai eficient decât la levurile non-tolerante, respectiv glicofite.

Drojdia *Saccharomyces cerevisiae* posedă potenţialul de a răspunde rapid şi efectiv la schimbările din mediul înconjurător, răspuns care este crucial pentru supravieţuirea oricărui organism. Expuse la concentraţii ridicate de sare celulele levuriene sunt supuse unui tip combinat de stres generat de potenţialul scăzut al apei şi de creşterea concentraţiei electroliţilor. Dacă cu osmostresul, drojdiile se întâlnesc în mod frecvent în mediul înconjurător datorită naturii lor saprofite, stresul ionilor de Na^+ reprezintă o provocare inedită. In acest caz răspunsul biologic, care este un proces activ supus unui control strict, prezintă trei faze distincte:

1. un răspuns celular imediat, apare ca o consecinţă directă a forţelor fizico-mecanice ce operează în aceste condiţii şi care determină pierderea rapidă a apei citoplasmatice, a presiunii turgor şi reducerea dimensiunilor celulei (stresul apei). Acest mecanism de salvare imediată este exprimat constitutiv în celule şi este independent de procesul de toleranţă care pregăteşte celula pentru reluarea dezvoltării. În general, se presupune că schimbările osmotice generează influxul apei din vacuole pentru a compensa parţial creşterea concentraţiei intracelulare, deşi existenţa acestei etape este controversată în literatura de specialitate. S-a remarcat însă că în funcţie de severitatea stresului imediat citoscheletul poate colapsa;
2. un răspuns primar la şocul hiperosmotic pentru a proteja, repara şi recupera. Se realizează arestarea ciclului celular ca parte a unei strategii de re-setare a mecanismelor celulare pentru a asigura ajustarea adecvată la noile condiţii, închiderea canalelor de glicerol Fps 1p şi sunt activate căile de transmitere a semnalelor. In mare măsură acestă fază a răspunsului corespunde cu răspunsul general la stres;
3. evenimente adaptative susţinute, reprezintă o sumă a proceselor metabolice iniţiate în faza anterioară. Are loc un influx puternic de apă care readuce celula la o mărime uşor mai mică decât cea iniţială, acumularea osmoliţilor prin diminuarea efluxului şi mărirea sintezei, intervin mecanismele implicate în homeostazia ionilor, în reparaţia citoscheletului (care va avea o organizare ajustată în funcţie de noile condiţii de mediu), se reia creşterea şi diviziunea celulară etc.

Efectele morfologice şi fiziologice ale halostresului la drojdii sunt iniţiate de pierderea aproape instantanee a apei din citoplasmă la o concentraţie de sare ce depăşeşte 0,3 M NaCl, care determină scăderea dimensiunilor celulei şi a presiunii turgor (figura 8.1).

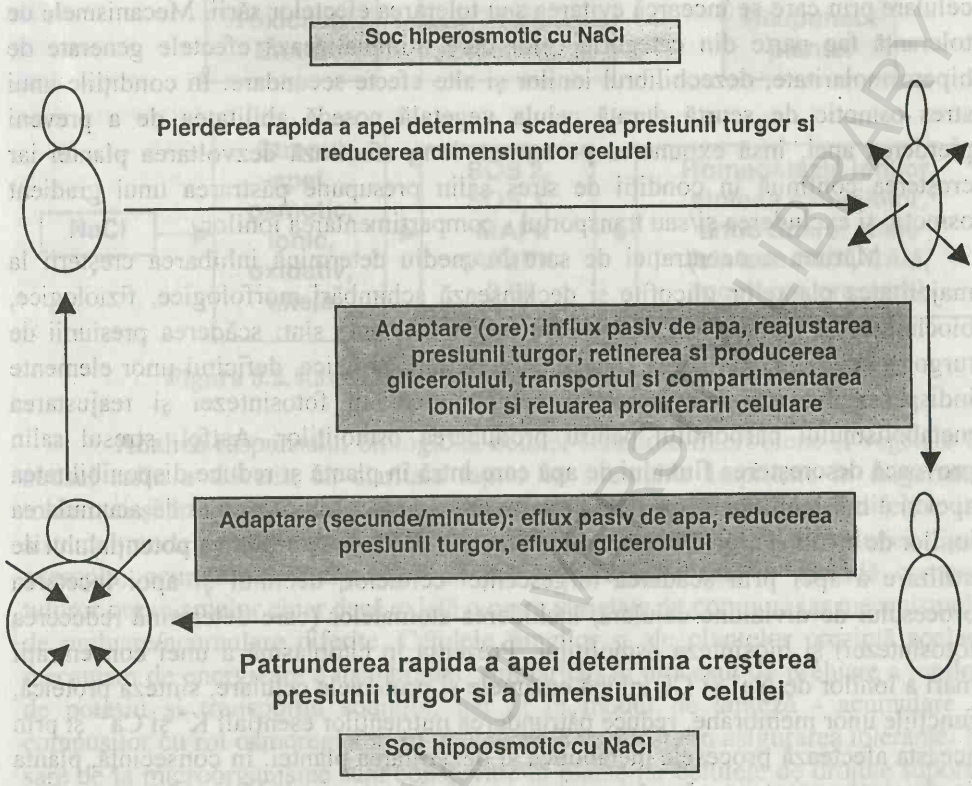


Figura 8.1. Răspunsului biologic al drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* la şocul hiper- şi hipoosmotic

Creşterea osmolarității mediului induce exprimarea unui set specific de gene şi diminuarea funcționării altora, proces mediat prin diferite căi moleculare în care compuşii osmoreglatori au un rol central. Aceste substanțe readuc la limite normale presiunea osmotică intracelulară, permit funcționarea proceselor metabolice la un nivel cât mai apropiat de normal şi asigură reluarea proliferării celulare. Adaptarea osmotică are un rol central în răspunsul la stresul salin, dar este implicată şi în alte procese morfogenetice şi de dezvoltare. Concomitent, adaptarea celulară presupune şi reglarea homeostaziei ionilor de Na^+, K^+ şi Cl^- prin excluderea ionilor toxici din citoplasmă şi/sau compartimentarea lor.

În natură plantele suferă rareori un singur tip de stres, dar halostresul este cel mai răspândit şi afectează profund celula vegetală deoarece este continuu şi împiedică creşterea ei. Plantele au capacitatea genetică de a tolera sarea, proprietate pierdută în mare parte de către glicofite, deşi la unele specii încă se mai observă (lucernă, tomate). Răspunsul celulei vegetale este homeostatic pentru statutul apei intracelulare şi integritatea proteinelor, care este perturbată în prezența unei soluții de sol cu salinitate ridicată şi de modificarea disponibilităților de apă. Fundamental, răspunsul plantei la acest stres este format dintr-o serie de procese

celulare prin care se încearcă evitarea sau tolerarea efectelor sării. Mecanismele de toleranţă fac parte din categoria celor care minimalizează efectele generate de hiperosmolaritate, dezechilibrul ionilor şi alte efecte secundare. În condiţiile unui stres osmotic de scurtă durată celula vegetală posedă abilitatea de a preveni pierderea apei, însă expunerea pe termen lung afectează dezvoltarea plantei iar creşterea continuă în condiţii de stres salin presupune păstrarea unui gradient osmotic şi excluderea şi/sau transportul - compartimentarea ionilor.

Mărirea concentraţiei de sare în mediu determină inhibarea creşterii la majoritatea plantelor glicofite şi declanşează schimbări morfologice, fiziologice, biochimice şi metabolice, dintre care mai importante sînt: scăderea presiunii de turgor a celulelor, inhibarea sintezei şi activităţii proteice, deficitul unor elemente indispensabile, alterarea peretelui celular, declinul fotosintezei şi reajustarea metabolismului carbonului pentru producerea osmoliţilor. Astfel, stresul salin provoacă descreşterea fluxului de apă care intră în plantă şi reduce disponibilitatea apei şi a nutrienţilor, iar pe de altă parte are un efect toxic generat de acumularea ionilor de sodiu şi clor. Planta resimte efectele produse de scăderea potenţialului de utilizare a apei prin scăderea turgescenţei celulelor, declinul şi apoi încetarea procesului de diviziune celulară, închiderea stomatelor (care determină reducerea fotosintezei) şi biosinteza osmoliţilor. Prezenţa în citoplasmă a unei concentraţii mari a ionilor de Na^+ şi Cl^- inhibă enzimele şi proteinele celulare, sinteza proteică, funcţiile unor membrane, reduce pătrunderea nutrienţilor esenţiali K^+ şi Ca^{2+} şi prin aceasta afectează procesele metabolice şi dezvoltarea plantei. În consecinţă, planta va prezenta o creştere scăzută sau nu va creşte şi poate pierde biomasă.

O imagine de ansamblu asupra răspunsului la stresul salin în plantele glicofite este prezentată în figura 8.2.

Majoritatea celulelor animale trăiesc în (chiar necesită) medii cu o concentraţie externă de sare de aproximativ 150 mM (soluţia fiziologică), spre deosebire de plante care nu pot tolera cantităţi mai mari de 50 - 100 mM NaCl. Astfel, din punct de vedere al toleranţei la salinitate există diferenţe evidente între celula vegetală şi cea animală, generate de modul de operare al circuitului chimioosmotic la aceste organisme. Această constatare are o explicaţie evoluţionistă - celulele animale au evoluat în apă de mare, în timp ce plantele au evoluat în apă proaspătă; care a determinat dezvoltarea în cadrul celulelor a unor pompe ionice diferite, adaptate condiţiilor de mediu. Celulele animale au pompe de sodiu (dependente de ATP) care pot tolera sarea, dar nu şi mediile acide; în timp ce plantele au dezvoltat pompe ionice primare (ATP-azice) care generează forţa conducătoare pentru transportul secundar al ionilor şi asigură toleranţa celulelor la mediile acide, dar sunt sensibile la sare. Conform acestei teorii se consideră că pompele protonice sunt predecesoarele pompelor de sodiu, care în forma lor primordială pot fi găsite printre alge şi protozoare.

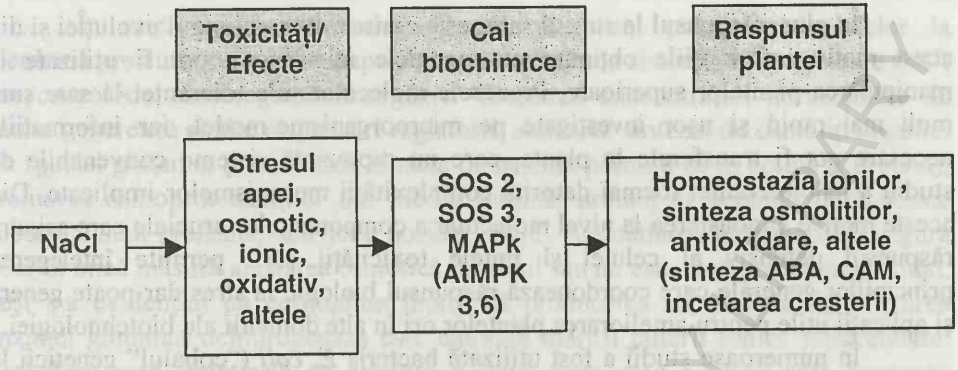


Figura 8.2. Răspunsul biologic al plantelor glicofite la salinitate

Analiza răspunsului biologic al celulei eucariote microbiene și vegetale la stresul salin a dovedit cu claritate faptul că strategiile implicate în asigurarea toleranței și în adaptare sunt similare, deși detaliile moleculare pot fi diferite, iar sistemul-model care asigură toleranța a fost conservat în cursul evoluției. Spre exemplu, acumularea compușilor cu rol osmoreglator este o metodă comună tuturor organismelor chiar dacă există o mare varietate de compuși iar mecanismele de preluare/acumulare diferite. Celulele fungilor și ale plantelor prezintă același mecanism de energizare a membranei, similarități în procesul de preluare a ionilor de potasiu și transportul sodiului, dar și în modul de sinteză - acumulare a compușilor cu rol osmoreglator. In plus, genele implicate în asigurarea toleranței la sare de la microorganisme sunt conservate în plante iar celulele de drojdie suportă expresia funcțională a genelor vegetale care codifică sistemele de transport. Calea MAP kinazică de răspuns la stresul osmotic și salin în *S. cerevisiae* și *Schizosaccharomyces pombe* - calea HOG este prezentă și la alți fungi, dar și în celulele animale unde mediază un răspuns protectiv la alte condiții de stres.

8.2. SISTEME-MODEL DE INVESTIGARE A MECANISMELOR CARE ASIGURĂ TOLERANȚA LA STRESUL SĂRII

Modelele microbiene au avut un rol important în evoluția științei și au permis înțelegerea unor aspecte fundamentale sau a unor concepte de biologie moleculară care ar fi fost mult mai dificil de studiat pe organismele superioare. Avantajele utilizării sistemelor-model procariot și eucariot (*Escherichia coli* și *Saccharomyces cerevisiae*) sunt asociate cu disponibilitatea informațiilor despre secvențierea genomului și ușurința cu care pot fi manipulate prin inginerie genetică, fapt care le-a propulsat în categoria microorganismelor favorite pentru programele de cercetare a toleranței la stres.

În plus, răspunsul la stresul salin este conservat de-a lungul evoluției și din acest motiv informațiile obținute pe modelele microbiene pot fi utilizate la manipularea plantelor superioare. Procesele moleculare ale toleranței la sare sunt mult mai rapid și ușor investigate pe microorganisme-model, iar informațiile necesare pot fi transferate la plante, care nu reprezintă sisteme convenabile de studiu a halotoleranței tocmai datorită complexității mecanismelor implicate. Din aceste motive cunoașterea la nivel molecular a componentelor cruciale care asigură răspunsul defensiv al celulei și țintele toxicității sării permite înțelegerea principiilor generale care coordonează răspunsul biologic la stres dar poate genera și aplicații utile pentru ameliorarea plantelor ori în alte domenii ale biotehnologiei.

În numeroase studii a fost utilizată bacteria *E. coli* ("cobaiul" geneticii la procariote), microorganism cartat genetic care deși este departe din punct de vedere filogenetic de plante, poate fi totuși folosit ca un sistem-model de investigare a mecanismelor toleranței la stresul salin bazat pe sinteza osmoliților și acumularea compușilor osmoprotectori. De asemenea, tulpinile bacteriene care realizează fixarea azotului au reprezentat baze de studiu și de izolare a genelor implicate în sinteza și/sau acumularea substanțelor cu rol osmoreglator.

O atenție deosebită a fost acordată modelului microbian eucariot *S. cerevisiae*, considerat cel mai vechi microorganism "domesticit" dar și cel mai studiat organism de pe planetă. Această drojdie este un candidat excelent pentru realizarea studiilor asupra diversității genetice și fenotipice deoarece se poate izola ușor în subpopulații, există linii isogene, este ușor de manipulat prin tehnici de inginerie genetică și fiind un sistem-model eucariot există numeroase informații despre bazele sale genetice. În ultima perioadă, folosind modelul levurian o serie de lucrări au investigat factorii celulari (progresia ciclului celular, rata de creștere, mărimea și vârsta celulei, ritmul celular, activitatea mitocondrială, reglarea epigenetică, prionii, variația stochastică) care contribuie la heterogenitatea non-genetică și au dezbătut mai ales rolul lor în determinarea rezistenței diferențiate a celulei eucariote la stres.

Arabidopsis thaliana, care deține statutul de sistem-model clasic pentru genetica plantelor, poate fi utilizată și în cercetarea halotoleranței, deși izolarea osmo- și halogenelor mutante prezintă o serie de dificultăți.

Alături de aceste organisme, culturile de țesuturi vegetale pot reprezenta o sursă importantă de mutații datorită variației somaclonale și chiar au fost izolate o serie de linii cu toleranță mărită la sare

8.2.1. Modelul procariot

Răspunsul fiziologic și genetic la bacterii (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Rhizobium* sp., *Azotobacter* sp., *Klebsiella* sp.) a fost intens investigat pentru că acestea acumulează în condiții de stres salin compuși cu rol osmoreglator de tipul trehaloză, prolină și glicin-betaină/trimetilglicină, care sunt comuni procariotelor și plantelor.

În microorganismul-model *E. coli* răspunsul primar al celulelor la pierderea presiunii turgor este reprezentat de inducerea sistemelor de preluare a K^+, ion cu rol de osmoreglator anorganic. Creşterea concentraţiei intracelulare de cation generează şi alte răspunsuri reglatorii: activarea sintezei de osmoliţi organici (în special glutamat şi trehaloză, sinteza de betaină pornind de la colină şi prolină), preluarea osmoprotectanţilor din mediu (colină, prolină şi betaină) dacă aceste substanţe sunt prezente, activarea porinei *ompC*. Acumularea glutamatului asigură doar în mică măsură ajustarea osmotică iar rolul său nu este încă pe deplin elucidat, deşi s-a evidenţiat cu certitudine faptul că producerea sa, iniţiată de activarea enzimei glutamat dehidrogenaza este datorată măririi puterii ionice intracelulare. Trehaloza este sintetizată cu ajutorul a două gene *otsA* şi *otsB* care formează operonul *ots* ("osmoregulated trehalose synthesis") indus în timpul fazei staţionare şi care participă la osmo- şi termotoleranţă. Biosinteza prolinei, care nu este stimulată de osmostres, este reglată prin feedback negativ de activitatea genei *proB*, la nivelul căreia o mutaţie punctiformă poate determina apariţia tulpinilor super-producătoare de prolină, cu toleranţă mărită la sare. În prezenţa compuşilor osmoprotectori în mediu intervine sistemul de transport a acestora codificat de operonul *proU* (format din genele structurale *proV*, *proW* şi *proX*) pentru transportul prolinei şi cu afinitate scăzută pentru betaină, genele *betT* pentru colină şi *proB* care au rol esenţial în mărirea osmotoleranţei celulei bacteriene. Colina poate fi utilizată pentru obţinerea betainei şi/sau glicin-betainei pe calea codificată de genele structurale *betA* şi *betB*. Capacitatea microorganismelor procariote de a asigura reglarea osmotică prin sinteza osmoliţilor este limitată datorită existenţei sistemelor de transport a osmoprotectanţilor care îmbunătăţesc toleranţa la sare. In general, la bacterii componenta majoră a toxicităţii sării este reprezentată de efectul osmotic iar acţiunea ionilor de sodiu are o importanţă mai redusă, deşi au fost evidenţiate mutante sensibile la sare care prezintă o capacitate scăzută de eliminare a cationului.

Modelul bacterian de reglare genetică este relevant pentru toleranţa plantelor la sare şi este compatibil cu observaţiile privind reglarea balanţei Na^+/K^+ în glandele salivare la insecte. Acest model prezintă modul în care expresia unor gene este reglată printr-un mecanism complex, bazat pe tăria ionilor şi schimbările generate de aceasta la nivelul ADN, în timp ce unele enzime, cum sunt cele implicate în sinteza glutamatului pot fi activate direct de potasiu. De asemenea, mecanismele de acumulare a compuşilor osmoreglatori şi osmoprotectori sunt asemănătoare la bacterii şi plante, astfel că modelul general evidenţiat la bacterii poate fi extins la celula vegetală, iar o serie de gene bacteriene au fost transferate şi se exprimă în plante.

La procariote, spre deosebire de plante, stresul osmotic este o problemă intracelulară mai importantă decât toxicitatea ionilor, motiv pentru care inhibiţia produsă de sare este similară cu cea determinată de concentraţii echivalente osmotice de zahăr ori polioli. Bacteriile experimentează în timpul stresului osmotic

o creştere evidentă a concentraţiei intracelulare de K^+, care este folosit la reglarea balanţei osmotice, în timp ce în plante, concentraţia de potasiu preluat scade permanent deoarece ionii de Na^+ şi K^+ intră în competiţie pentru transportorii cationici din membrana plasmatică. Astfel, tentativa celulelor vegetale de a folosi potasiu cu rol osmoreglator pare mai degrabă o reminescenţă cu originea în comportamentul bacteriilor, care însă folosesc ambele sisteme (sistemul constitutiv cu afinitate redusă *trk* şi sistemul cu afinitate mare *kdpABC* pentru potasiu) la intensificarea preluărilor de cation.

Genele bacteriene, în special cele implicate în mărirea producţiei de prolină, glicin-betaină, fructan ori manitol au fost exprimate în plante, obţinându-se organisme transgenice cu toleranţă mărită la sare; deşi uneori nu s-a remarcat o corelaţie clară între acumularea osmolitului şi toleranţa la salinitate. În plus, până în prezent nu s-a descris o omologie clară între componentele implicate în adaptarea la clorură de sodiu de la bacterii şi plante (deşi unele căi metabolice sunt similare - calea de biosinteză a prolinei şi trimetilglicinei).

8.2.2. Modelul eucariot

Utilizarea drojdiilor ca model eucariot fundamental pentru studiul mecanismelor care asigură toleranţa la sare are la bază natura acestor organisme unicelulare, care în mediul lor natural suferă în mod frecvent schimbări rapide ale osmolarităţii şi constatarea că mecanismele implicate în homeostazia ionilor sunt similare la fungi şi plante. Majoritatea cercetărilor au fost realizate la *Saccharomyces cerevisiae*, datorită interesului comercial şi existenţei a numeroase tehnici de manipulare genetică; dar au fost studiate şi alte categorii de drojdii, în special *Schizosaccharomyces pombe*, la care căile de transmitere a semnalelor sunt mai apropiate de cele prezente în celulele animale. O serie de informaţii relevante pentru evitarea efectelor negative generate de drojdia patogenă *Candida albicans* şi de specia osmotolerantă *Zygosaccharomyces rouxii*, care produce alterarea alimentelor au fost furnizate de analiza mecanismelor implicate în osmoreglare; în timp ce studiile la drojdia marină cu toleranţă mărită la sodiu *Debaryomyces hansenii* au fost focalizate spre elucidarea mecanismelor de transport a ionilor şi compararea aspectelor specifice evidenţiate cu modelul observat la *S. cerevisiae*.

Drojdiile sunt frecvent întâlnite pe materiale vegetale şi animale şi experimentează continuu schimbări rapide şi dramatice în activitatea apei. O celulă levuriană dezvoltată, spre exemplu, pe un fruct uscat este expusă pentru o perioadă de timp la creşterea concentraţiei de zahăr, iar după prima ploaie va trebui să se adapteze unui şoc hipoosmotic. În acest caz este evident faptul că abilitatea de a percepe şi a elabora un răspuns adecvat la aceste fluctuaţii osmotice rapide şi progresive este o necesitate pentru celula eucariotă, care asigură supravieţuirea acesteia şi subsecvent adaptarea. Din acest motiv s-a formulat ipoteza: capacitatea de a supravieţui la schimbările în disponibilitatea apei este o proprietate intrinsecă a celulei, care presupune existenţa unor sisteme capabile să perceapă rapid şi să

răspundă la interval de câteva secunde de la declanşarea schimbării, indiferent de natura acesteia. Adaptarea la şocul hiperosmotic şi salinitate durează câteva ore şi este un proces activ bazat pe un răspuns biologic care urmăreşte menţinerea activităţii celulare şi reluarea diviziunii în celulele complet adaptate. Ambele procese sunt controlate într-o manieră foarte strictă iar principiile care le guvernează sunt conservate printre eucariote, motiv pentru care drojdiile au devenit modelul preferat de studiu al proceselor fundamentale care coordonează toleranţa şi adaptarea la stresul salin.

Din punct de vedere molecular există o mare similaritate între fungi şi plante la nivelul componentelor implicate în homeostazia sodiului şi potasiului însă modelul eucariot nu poate furniza detalii despre efectele negative ale ionilor de clor, care sunt la fel de toxici în plante ca şi ionii de sodiu. De fapt, în contrast cu situaţia de la bacterii şi similar plantelor toxicitatea sodiului este procesul dominat în stresul salin la drojdii. În celulele levuriene preluarea Na^+ este realizată printr-un sistem transportor cationic monovalent care are ca substrat preferat potasiul (Trk 1/2p) iar efluxul pe mai multe căi, în special pe calea Tok 1p. Discriminarea între ionii de Na^+ şi K^+ este maximă în timpul fazei exponenţiale de creştere şi scade continuu pe măsură ce populaţia celulară ajunge în faza staţionară a dezvoltării. La plante există transportori (spre exemplu, AKT 1, KAT 1, HKT) şi canale cationice asemănătoare din punct de vedere electrofiziologic cu transportorii de la drojdii iar situaţia discriminării ionice este similară, selectivitatea fiind mai mare în ţesuturile plantelor active comparativ cu ţesuturile bătrâne. Modul de funcţionare şi de reglare a transportorilor şi canalelor cationice este asemănător şi se bazează pe acţiunea unor pompe ATPazice care furnizează forţa conducătoare pentru transportul activ al ionilor prin membrana plasmatică. În plus, peptida Pmp 3p asociată cu activitatea pompelor protonice şi care determină depolarizarea membranei este conservată în plante iar proteina omoloagă din plante transferată în celulele levuriene este funcţională. Similitudini au fost remarcate şi la nivelul canalelor de potasiu şi clor (Tok 1p - ORK şi Gef 1p - CLC) şi a antiporterilor Na^+/H^+ implicaţi în efluxul sodiului (Nha 1p din membrana plasmatică la *S. cerevisiae* cu NHX 1 din tonoplast şi Sod 2p de la *S. pombe* cu SOS 1 la plante). Diferenţele între fungi şi plante în ce priveşte transportul ionilor sunt asociate cu faptul că fungi folosesc canale IRK de transport a K^+ prin membrana vacuolară, în timp ce la plante există pompe H^+-pirofosfataze vacuolare iar plantele nu au ATPaze de eliminare a Na^+ de tipul Ena 1p.

La nivelul factorilor reglatori implicaţi în homeostaziei ionilor s-au constatat asemănări, astfel un factor care asigură menţinerea constantă a concentraţiei intracelulare de potasiu este similar cu transinhibiţia sau inhibiţia prin feedback descrisă la plante. În plus, o proteină reglatoare care modulează activitatea canalelor ionice la drojdii Hal 1p a fost transferată la plante (*Arabidopsis thaliana, Nicotiana tabacum, Cucumis melo, Citrullus lanatus, Lycopersicon esculentum*), unde este conservată şi indusă specific de stresul salin şi hormonul ABA şi îmbunătăţeşte toleranţa la sare.

Reglarea osmotică la drojdii se realizează via sintezei/transportului de glicerol şi acumulării de trehaloză, compuşi cu rol osmoreglator similar cu cei de la plante, unde se acumulează preferenţial prolină, zaharoză şi betaină. La nivelul osmosenzorilor există similarităţi între Sln 1p de la *S. cerevisiae* şi ATHK 1 de la *A. thaliana*, care prezintă omologie de 49% între domeniile implicate în receptarea semnalului. Osmoreglarea este asociată şi cu sinteza - secreţia proteinelor vacuolare, fapt remarcat la mutantele levuriene cu defecte în biogeneza vacuolelor care prezintă osmosensibilitate; la fel ca şi celulele vegetale cu deleţii la nivelul genelor implicate în funcţionarea tonoplastului. O interpretare a acestor rezultate propune ipoteza că anumite funcţii necesare pentru producerea vacuolelor sunt utile şi în procesul de reglare osmotică. În plus, acumularea ionilor toxici se realizează în vacuole, proces puternic conservat printre eucariote în ce priveşte ionii de Na^+. De asemenea, elementele citoscheletului sunt implicate în procesul general de adaptare la stresul osmotic, identificându-se mutante levuriene şi vegetale la nivelul proteinelor din structura citoscheletului care prezintă sensibilitate osmotică.

Utilizarea acestui sistem-model eucariot în domeniul stresului osmotic şi salin a furnizat noi perspective pentru cercetările de obţinere a plantelor transgenice cu toleranţă mărită la salinitate. În plus, metoda de identificare a halogenelor vegetale prin transferul şi exprimarea acestora în celula levuriană propune o nouă modalitate rapidă de înţelegere a mecanismelor care coordonează toleranţa la sare în plante.

8.2.3. Diversitatea fenotipică în toleranţa la stresul sării

In ultimii ani cercetările asupra toleranţei la stres s-au orientat spre zone mai puţin studiate şi s-a constatat că este necesară extinderea demersului referitor la heterogenitate (variabilitate, diversitate), fenomen care poate aduce informaţii relevante pentru descifrarea mecanismelor implicate. Variabilitatea genetică şi fenotipică asigură în natură supravieţuirea şi persistenţa speciilor, dar datorită complexităţii şi magnitudinii sale acest fenomen a fost marginalizat şi analizat mai mult din punct de vedere "fenomenologic" şi mai puţin în ce priveşte bazele moleculare. Noile tehnologii, aşa cum este citometria în flux asociată cu sortarea celulară FACS ("flow activated cell sorting") ori cu tehnologia proteinelor reporter fluorescente au avut un impact major în acest domeniu deoarece permit studiul la nivelul unei singure celule ("single-cell analysis"). Această tehnică prezintă o serie de avantaje:

- determinările se realizează "in situ", fără distrugerea celulei sau modificarea unor proprietăţi fiziologice ale acesteia;
- se pot analiza rapid şi simultan un număr variabil de parametrii (viabilitatea, profilul ADN, se monitorizează expresia genelor/proteinelor şi se determină localizarea intracelulară a proteinei de interes etc.);
- măsurătorile se realizează instantaneu iar posibilitatea de a apărea artefacte este extrem de redusă;

- rezultatele sunt obținute prin analiza fiecărei celule în populații formate din milioane de celule.

Heterogenitatea fenotipică ("cell-to-cell variability") descrie variațiile non-genetice care există între celulele individuale dintr-o populație uniformă din punct de vedere genetic (isogenă, clonală). Bazele moleculare ale acestei heterogenități nu sunt bine cunoscute, dar a fost dovedit faptul că principalele procese de control care reglează funcțiile celulare (transcripția, translația genelor, modificările post-translaționale) sunt activate diferit în diverse celule ale unei populații clonale.

Noțiunea de diversitate fenotipică este corelată cu diferențele apărute în expresia bazală a genelor, spre deosebire de variabilitatea genetică care se referă la posesia anumitor gene. Din acest motiv heterogenitatea "cell-to-cell" este non-genetică, deci nu se transmite ereditar celulelor fiice, ceea ce complică extrem de mult studierea mecanismelor care fundamentează acest fenomen.

La nivel microbian exemplele clasice de heterogenitate non-genetică sunt reprezentate de: persistența unui număr mic de bacterii sau fungi după tratamentul cu antibiotice, rezistența unor subpopulații de microorganisme saprofite la efectul conservanților, fenomenul de hipersensibilitate osmotică și la nivel molecular de inducerea diferențiată a operonului lactozei în *E. coli* ori de heterogenitatea în expresia genei *Hsp 104* supusă unui șoc termic moderat la *S. cerevisiae* etc. Aceste exemple, dar și alte studii ilustrează faptul că în diverse populații isogene (culturi celulare de laborator, culturi utilizate în fermentațiile industriale, zone de infecție), unde variabilitatea genetică este absentă, heterogenitatea fenotipică este determinantul care asigură supraviețuirea și persistența speciei.

Astfel, cunoașterea mecanismelor care dirijează diversitatea fenotipică în condiții de stres salin ar permite mărirea sau micșorarea, în funcție de necesități, a ratei de supraviețuire a populației respective ori reglarea inducerii diferențiate a genelor. În acest caz identificarea bazelor moleculare care modulează rezistența heterogenă la salinitate și a factorilor care o influențează are atât o importanță teoretică, dar și practică. Experiențele realizate au explorat toleranța și rezistența non-genetică la sare în microorganismul-model eucariot *S. cerevisiae*, pentru ca modelul să fie extins la plante care prezintă mecanisme de adaptare similare cu fungii. S-a utilizat o combinație de tehnici microbiologice, citometria în flux și tehnologia GFP ("green fluorescent protein") care au permis în final monitorizarea expresiei proteinei de fuziune intracelulare GPD1p-EGFP.

Rezistența heterogenă la stresul salin, reflectată prin diversitatea răspunsului la acest stres este larg documentată în literatura de specialitate, atât la microorganisme, cât și la plante, dar abia în ultimii ani a fost explicată în ce privește mecanismele moleculare care o determină. S-a pornit de la ipoteza că în mediul natural al levurilor activitatea apei poate varia într-un domeniu foarte larg și uneori rapid, datorită influenței factorilor externi, dar și activității celulelor de drojdie. Schimbări dramatice de osmolaritate induc în aceste celule eucariote un răspuns biologic rapid și activ, care pare a fi o proprietate intrinsecă ce permite supraviețuirea. Abilitatea de a supraviețui și a se adapta la noile condiții este

asigurată de mecanisme care au la bază diversitatea fenotipică şi/sau variabilitatea genetică şi care asigură persistenţa speciei.

Primele cercetări asupra variabilităţii non-genetice au urmărit toleranţa la halostres a tulpini parentale *S. cerevisiae* BY 4741 şi a 19 linii isogene deficiente în genele cunoscute a fi implicate predominat în răspunsul la stresul NaCl-hiperosmotic şi salin (tabelul 8.3). Determinările calitative au fost realizate prin metoda spoturilor ("spotting") pe medii saline cu glucoză ca sursă de carbon şi energie (YPG-NaCl 0 - 10%) iar pentru studiul comparativ al variabilităţii genetice a fost analizată halotoleranţa tulpini parentale *S. cerevisiae* W 303-1A (înrudită filogenetic cu BY 4741, ambele provenind din tulpina de colecţie S288C).

Tabelul 8.3

Tulpinile testate deficiente în genele implicate în răspunsul la stresul NaCl-hiperosmotic şi salin

Tulpina isogenă	*Gena*	*Produsul genei*
YJL129C (*trk1*Δ)	*TRK 1*	Transportori pentru ionii de K^+ în celulă
YKR050W (*trk2*Δ)	*TRK 2*	
G 1.9 şi G 1.9.1 (*ena1*Δ)	*ENA 1*	ATP-ază implicată în efluxul ionilor de Na^+
YPR005C (*hal1*Δ)	*HAL 1*	Proteine solubile cu rol reglator în homeostazia ionilor
YKR072C (*hal3*Δ)	*HAL 3*	
YJL165C (*hal4,5*Δ)	*HAL 4, 5*	
YOL064C (*hal2*Δ)	*HAL 2 /MET 22*	Nucleotidază sensibilă la ionii de Na^+, implicată în metabolismul metioninei
YML106W (*ura5*Δ)	*URA 5*	Enzimă Na-sensibilă implicată în biosinteza uracilului
YDL022W (*gpd1*Δ)	*GPD 1*	Enzime implicate în biosinteza glicerolului
YOL059W (*gpd2*Δ)	*GPD 2*	
YIL053W (*gpp1*Δ)	*GPP 1*	
YER062C (*gpp2*Δ)	*GPP 2*	
YLL043W (*fps1*Δ)	*FPS 1*	Proteină care mediază importul şi exportul glicerolului în celulă
YLR113W (*hog1*Δ)	*HOG 1*	MAP kinază cu rol important în calea HOG
YMR126C (*tps1*Δ)	*TPS 1*	Enzime implicate în biosinteza trehalozei
YDR074W (*tps2*Δ)	*TPS 2*	
YLL026W (*hsp104*Δ)	*HSP 104*	Proteină implicată în răspunsul general la stres
YJR104C (*sod1*Δ)	*SOD 1*	Enzimă implicată în stresul oxidativ

Genele testate pot fi clasificate în patru mari categorii, în funcţie de rolul lor:

- gene corelate cu răspunsul general la stres (*TPS 1, TPS 2, SOD 1, HSP 104*);
- gene implicate în biosinteza osmoliților și transportul lor prin membrana plasmatică (*GPD 1, GPD 2, GPP 1, GPP 2, FSP 1, HOG 1*);
- transportori de ioni și reglatori în transportul ionilor (*TRK 1, TRK 2, ENA 1/PMR 2, HAL 1, HAL 3, HAL 5*);
- gene-țintă pentru toxicitatea ionilor (*HAL 2/MET 22, URA 5*).

Screeningul mutanților care afectează supraviețuirea în mediu cu sare a dovedit că majoritatea tulpinilor prezintă sensibilitate mărită la stresul salin comparativ cu tulpina parentală, o parte dintre ele fiind incapabile să formeze colonii pe medii cu 5 - 6% NaCl, în timp ce tulpina isogenă *ena1*Δ nu a putut crește pe medii cu peste 3% sare (figura 8.3). În plus, s-au remarcat diferențe în toleranța la sare chiar la tulpinile înrudite filogenetic, *S. cerevisiae* W303-1A fiind mai rezistentă și poate crește pe mediu YPG-NaCl 9%, spre deosebire de tulpina BY 4741 a cărei dezvoltare este stopată la concentrația de 7 - 8% NaCl în mediu.

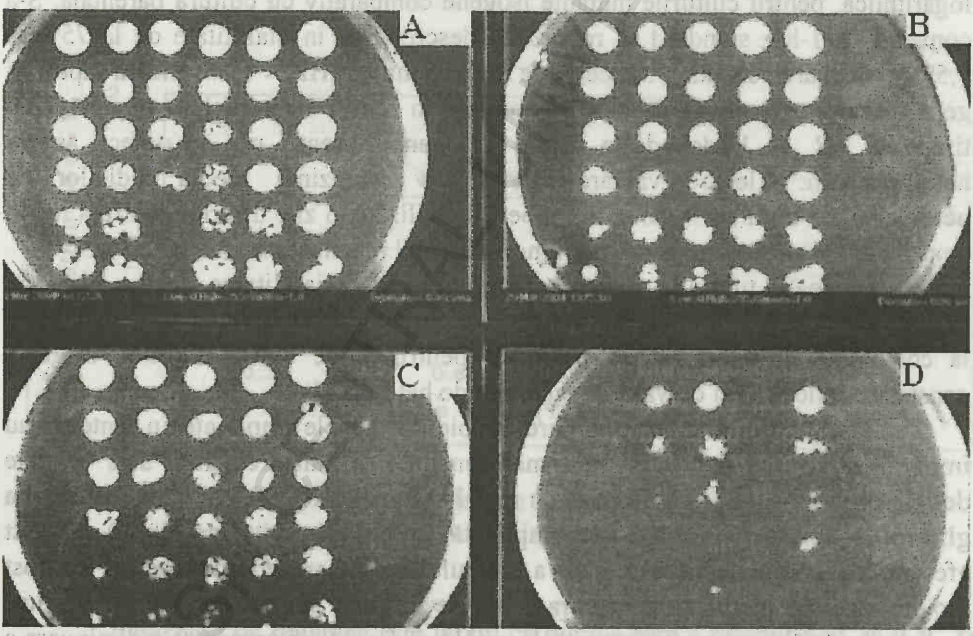


Figura 8.3. Toleranța la stresul salin pentru tulpinile parentale *S. cerevisiae* BY 4741 (coloana 1), W 303-1A (coloana 5) și tulpinile isogene YJL165C (hal5Δ coloana 2), YML106W (ura5Δ coloana 3), YJR104C (sod1Δ coloana 4), G 1.9.1 (ena1Δ coloana 6) pe mediile YPG (**A**) și YPG-NaCl 2% (**B**), 5% (**C**), 9% (**D**)

Comparația calitativă între toleranța mutantelor deficiente în genele cu rol major în răspunsul la stresul salin oferă numeroase informații despre factorii cruciali care intervin în supraviețuirea și adaptarea pe medii saline. Dar pentru a

determina corelaţia între heterogenitate şi toleranţa la sare a mutantelor este necesară analiza curbelor doză (concentraţia de clorură de sodiu) - răspuns (viabilitate). La realizarea acestui experiment s-a pornit de la ipoteza că dacă expresia diferenţiată a produsului unei gene contribuie la heterogenitate, atunci distrugerea genei va determina o diminuare a heterogenităţii în răspunsul tulpinii respective comparativ cu tulpina parentală. În acest sens, s-au analizat curbele doză-răspuns în experienţe de toleranţă la stresul salin pentru tulpinile parentale *S. cerevisiae* BY 4741 şi W 303-1A şi cele 19 tulpini mutante isogene, culturile fiind obţinute în experimente paralele, realizate în acelaşi timp şi s-au comparat gradientele curbelor pentru mutantă *versus* parentală folosind programul R (versiunea 2.0.0), disponibil pe internet la adresa *www.sourcekeg.co.uk/cran*. Pentru a facilita comparaţia curbelor s-a definit indicele de heterogenitate HR - raportul între creşterea în unităţi logaritmice a concentraţiei de agent stresant (NaCl) necesară pentru a obţine o descreştere în viabilitate (UFC) cu o unitate logaritmică, pentru culturile mutante isogene comparativ cu cultura parentală. S-a convenit ca 1-log standard să reprezinte descreşterea în viabilitate de la 75% la 7,5%. O valoare scăzută a indicelui de heterogenitate (HR < 1) va indica faptul că gena distrusă acţionează în condiţii normale în sensul creşterii heterogenităţii, în timp ce HR ~ 1 dovedeşte faptul că gena absentă nu are efect asupra heterogenităţii. Fiecare valoare HR relativ reprezintă media indicilor de heterogenitate obţinuţi în două-trei repetiţii, realizate în zile diferite pentru a lua în considerare şi variaţia zi-de-zi, obţinîndu-se astfel rezultate cât mai precise.

La toate tulpinile mutante isogene testate viabilitatea scade odată cu mărirea concentraţiei de sare iar gradientele curbelor doză-răspuns au fost similare la comparaţia mutantă *versus* parentală pentru multe dintre tulpinile isogene, constatare reflectată şi de valorile indicelui de heterogenitate.

Totuşi, tulpinile isogene care au pierdut genele implicate în sinteza sau importul/exportul osmoliţilor sunt mai sensibile la halostres, mai ales celulele deficiente în Hog 1p (MAP kinază cu rol vital în calea HOG)) şi Gpd 1p (enzima glicerol-3 -fosfat dehidrogenaza, implicată în producerea glicerolului) au fost afectate de componenta osmotică a stresului salin iar fenotipurile lor au fost monitorizate pe medii cu concentraţii reduse de sare, până la 6% NaCl. In plus, curbele doză-răspuns pentru mutantele *gpd1*Δ şi *hog1*Δ au prezentat o diminuare a heterogenităţii şi un indice HR ~ 0,82, respectiv 0,83 (figurile 8.4 – 8.5). Totuşi, absenţa genei *GPD 2* (omoloagă cu *GPD 1*) şi a celorlalte două gene implicate în calea metabolică de biosinteză a glicerolului (*GPP 1* şi *GPP 2*) nu a generat curbe doză-răspuns cu HR < 1.

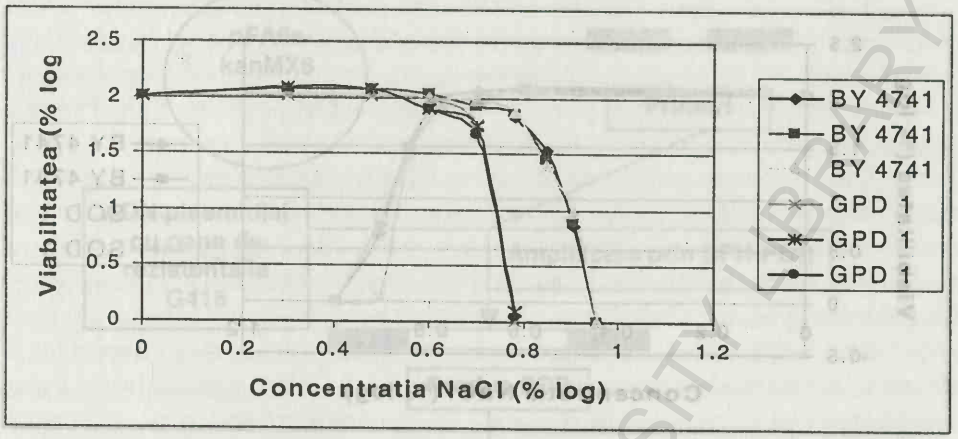


Figura 8.4. Curba doză-răspuns în toleranța la stresul salin pentru tulpina parentală *S. cerevisiae* BY 4741 și tulpina isogenă YDL022W (gpd1Δ)

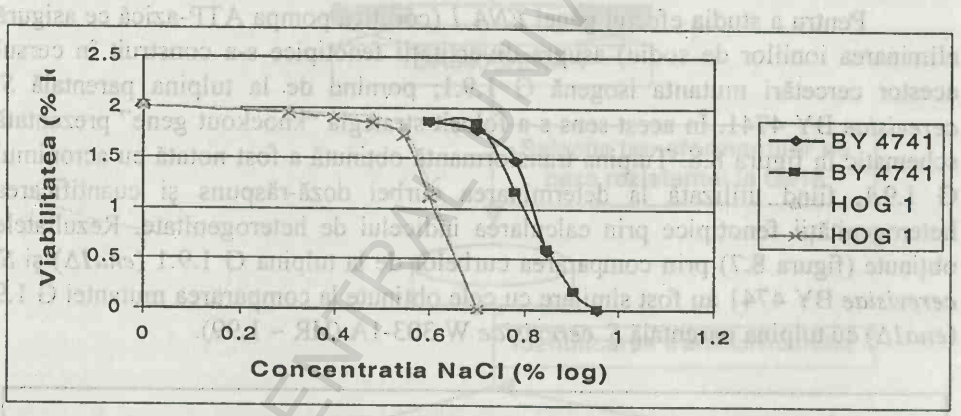


Figura 8.5. Curba doză-răspuns în toleranța la stresul salin pentru tulpina parentală *S. cerevisiae* BY 4741 și tulpina isogenă YLR113W (hog1Δ)

Interesant de remarcat este faptul că tulpina care a pierdut Sod 1p (Cu, Zn superoxid dismutază, implicată în stresul oxidativ și toxicitatea metalelor) a dovedit o sensibilitate netă la expunerea timp de 10 minute la cupru și o diminuare a heterogenității, cu un HR ~ 0,63, în experiențe realizate într-o manieră similară cu cea prezentată anterior. Totuși, în experimentele de toleranță la stresul salin gena *SOD 1* nu a avut un efect similar cu cel observat la expunerea de scurtă durată la cupru iar HR ~ 1,15 indică faptul că această genă nu afectează heterogenitatea, deși expresia transcripțională a genei este indusă de schimbările în salinitatea extracelulară (figura 8.6).

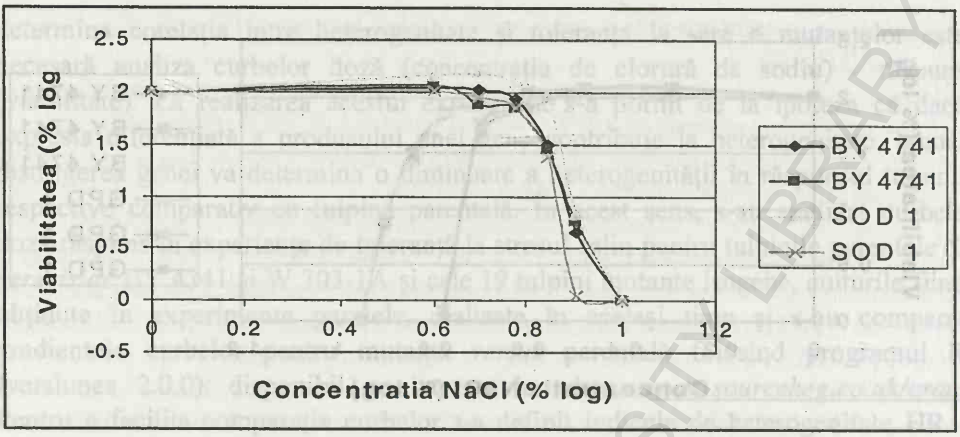


Figura 8.6. Curba doză-răspuns în toleranța la stresul salin pentru tulpina parentală *S. cerevisiae* BY 4741 și tulpina isogenă YJR104C (sod1Δ)

Pentru a studia efectul genei *ENA 1* (codifică pompa ATP-azică ce asigură eliminarea ioniilor de sodiu) asupra diversității fenotipice s-a construit în cursul acestor cercetări mutanta isogenă G 1.9.1, pornind de la tulpina parentală *S. cerevisiae* BY 4741. În acest sens s-a folosit strategia "knockout gene" prezentată schematic în figura 8.8. Tulpina transformantă obținută a fost notată cu acronimul G 1.9.1, fiind utilizată la determinarea curbei doză-răspuns și cuantificarea heterogenității fenotipice prin calcularea indicelui de heterogenitate. Rezultatele obținute (figura 8.7) prin compararea curbelor de la tulpina G 1.9.1 (*ena1*Δ) și *S. cerevisiae* BY 4741 au fost similare cu cele obținute la compararea mutantei G 1.9 (*ena1*Δ) cu tulpina parentală *S. cerevisiae* W 303-1A (HR ~ 1,99).

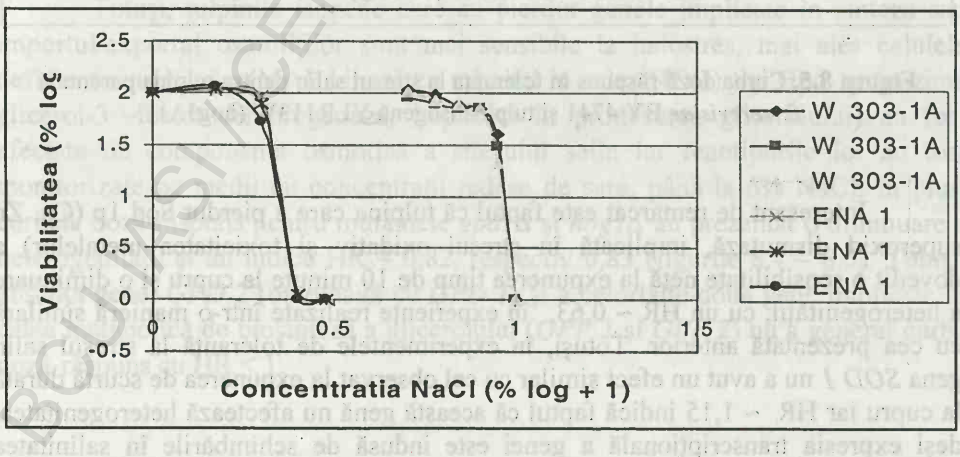


Figura 8.7. Curba doză-răspuns în toleranța la stresul salin pentru tulpina parentală *S. cerevisiae* W 303-1A și tulpina isogenă G 1.9 (ena1Δ)

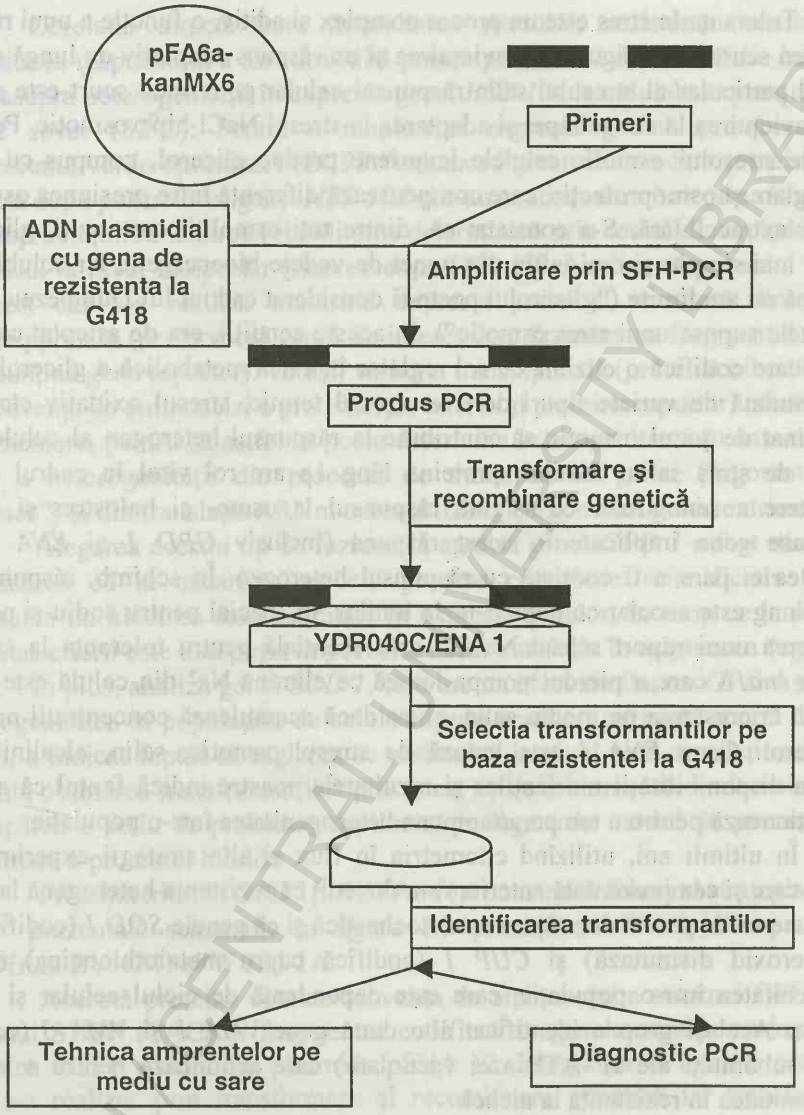


Figura 8.8. Strategia "knockout gene"

În concluzie, s-a constatat că populațiile formate din celule deficiente în proteinele Gpd 1p şi Hog 1p prezintă o diminuare a heterogenității (indice de heterogenitate 0,82, respectiv 0,83), în timp ce deficiența în Ena 1p măreşte diversitatea (HR ~ 1,99). Activitatea genelor *GPD 1*, *HOG 1* şi *ENA 1* influențează heterogenitatea, în sensul că primele două gene contribuie la asigurarea răspunsului heterogen, iar *ENA 1* temperează/supresează heterogenitatea într-o populație isogenă.

IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Toleranţa la stres este un proces complex şi aditiv, o funcţie a unui răspuns pe termen scurt care asigură supravieţuirea şi un răspuns adaptativ de lungă durată. În cazul particular al stresului salin răspunsul celular pe termen scurt este asociat cu supravieţuirea la stresul apei şi adaptarea la stresul NaCl-hiperosmotic. Pentru a răspunde stresului osmotic celulele levuriene produc glicerol, compus cu rol în osmoreglare şi osmoprotecţie, care compensează diferenţa între presiunea osmotică intra- şi extracelulară. S-a constatat că, dintre toţi osmoliţii cunoscuţi, glicerolul este cel mai simplu şi mai ieftin din punct de vedere bioenergetic iar solubilitatea lui în apă nu are limite ("glicerolul poate fi considerat cadoul lui Dumnezeu pentru eucariotele supuse unui stres osmotic"). În aceste condiţii, era de aşteptat ca gena *GPD 1* care codifică o enzimă cu rol reglator în calea metabolică a glicerolului şi este stimulată de variate tipuri de stres (şocul termic, stresul oxidativ etc.), dar predominat de şocul osmotic să contribuie la răspunsul heterogen al celulelor în condiţii de stres salin. Similar, proteina Hog 1p are rol vital în cadrul căi de transmitere a semnalelor ce asigură răspunsul la osmo- şi halostres şi induce numeroase gene implicate în acest răspuns (inclusiv *GPD 1* şi *ENA 1*) iar activitatea ei pare a fi corelată cu răspunsul heterogen. În schimb, răspunsul pe termen lung este asociat cu homeostazia ionilor, în special pentru sodiu şi potasiu. Menţinerea unui raport scăzut Na^+/K^+ este esenţială pentru toleranţa la sare iar mutanta *ena1*Δ care a pierdut pompa ionică ce elimină Na^+ din celulă este foarte sensibilă la creşterea pe mediu salin, chiar dacă acumulează concentraţii normale de glicerol. Gena *ENA 1* este indusă de stresul osmotic, salin, alcalinitate şi scăderea disponibilităţii nutrienţilor şi rezultatele noastre indică faptul că această genă acţionează pentru a tempera/tampona heterogenitatea într-o populaţie.

În ultimii ani, utilizînd citometria în flux şi alte strategii experimentale (printre care şi cea prezentată anterior) s-a dovedit că rezistenţa heterogenă la cupru (în expunerea de scurtă durată) nu este stochastică şi că genele *SOD 1* (codifică Cu, Zn superoxid dismutază) şi *CUP 1* (codifică cupru metalothioneina) măresc heterogenitatea într-o populaţie, care este dependentă de ciclul celular şi vârsta celulelor. Acelaşi grup a identificat alte două gene *VMA 1* şi *VMA 3* (codifică diferite subunităţi ale H^+-ATP azei vacuolare) care acţionează pentru a supresa heterogenitatea în rezistenţa la nichel.

În cercetările următoare s-a monitorizat răspunsul intrinsec la nivelul fiecărei celule din populaţii isogene formate din milioane de celule expuse la un stres salin moderat folosind citometria în flux şi tehnologia GFP. Rezistenţa intrinsecă la stres se referă la abilitatea celulei de a supravieţui şi a se adapta unui potenţial stres letal (în acest caz stresul salin moderat) fără nici o condiţionare prealabilă, în timp ce răspunsul intrinsec reflectă maniera în care aceste celule declanşează mecanismele biologice de toleranţă/adaptare. Această rezistenţă heterogenă non-genetică la stres a celulelor dintr-o populaţie isogenă este generată de diversitatea răspunsurilor, care la nivel molecular se reflectă printr-o variaţie în răspunsul transcripţional şi/sau translaţional al unor gene.

Corelația directă între intensitatea stresului, rezistența heterogenă și diversitatea răspunsului a fost dovedită pentru prima dată de cercetările lui *Attfield* et al. asupra heterogenității în expresia genei *HSP 104* la celulele expuse unui stres termic sever (52^0C). Pentru a monitoriza expresia genică proteina reporter fluorescentă verde optimizată (EGFP "enhanced-green fluorescent protein") a fost inserată după promotorul genei *HSP 104* și s-au analizat simultan prin citometrie în flux supraviețuirea la stres (viabilitatea determinată prin testul de excludere PI) și răspunsul la nivel molecular (fluorescența GFP) [5]. Analiza răspunsului intrinsec în acest caz s-a realizat urmărind expresia proteinei rezultată din fuziunea transcripțională (promotorul genei de interes este fuzionat cu fragmentul de ADN care conține gena reporter). Totuși, varianta translațională (proteină hibridă formată din secvența de aminoacizi a proteinei de interes și proteina reporter) oferă avantaje suplimentare, pentru că astfel se poate determina heterogenitatea în ansamblu, ca o sumă a heterogenității din procesul de transcriere a genei ("zgomotul genic intrinsec") și din translația ARNm corespunzător ("zgomotul genic extrinsec").

Alegerea acestui tip de fuziune la analiza genei *GPD 1* a fost stimulată de constatarea că la eucariote ambele procese contribuie semnificativ pentru a determina un nivel de stochasticitate în expresia genelor, în timp ce la procariote rata transcrierii este mai puțin importantă decât translația în asigurarea "zgomotului genic". În plus, analiza genei *SOD 1*, care are un efect similar cu *GPD 1* și mărește heterogenitatea în populațiile de celule expuse pentru o perioadă scurtă de timp la cupru, a indicat faptul că reglarea se realizează la nivel post-translațional [64]. În schimb, obținerea transformanților prin acest tip de fuziune este mult mai dificilă și pot apărea o serie de probleme suplimentare legate de modul de procesare și de exprimare a proteinei hibride.

Proteina hibridă GPD1p-EGFP a fost construită folosind strategia "tagging gene" prezentată schematic în figura 8.9 pornind de la tulpinile parentale *S. cerevisiae* BY 4741 și W 303-1A.

Această proteină conține secvența de aminoacizi a enzimei GPD 1p, fără codonul STOP (TAG) și fragmentul codificat de genele pentru markerul His și proteina EGFP stabilă din plasmida pSVA 12. Integrarea în locusul non-esențial HO s-a realizat prin transformare și recombinare genetică iar transformanții - coloniile His^+ au fost selectați pe mediu YNB-His^- și confirmați prin diagnostic PCR (figura 8.10) și pe baza fluorescenței GFP.

Transformanții obținuți GPD1-EGFP stabil (Tr. 57, Tr 83 în *S. cerevisiae* BY 4741, Tr. 135, Tr. 141 în *S. cerevisiae* W 303-1A) au fost analizați calitativ la microscopul cu fluorescență (figura 8.11 – 8.12) și cantitativ prin citometrie în flux cu ajutorul programelor WinMDI și SIMfit disponibil online la adresele: http://www.facs.scripps.edu/software.html și http://www.simfit.man.ac.uk/.html. Rezultatele au fost comparate cu datele obținute la determinarea heterogenității genei *ACT 1* (care este similară cu a multor gene care se exprimă constituiv) considerată etalon pentru a determina calitativ gradul de heterogenitate în sinteza

proteinei GPD 1p-EGFP. Stabilitatea în expresia genelor constitutive a fost raportată de mai multe studii de specialitate.

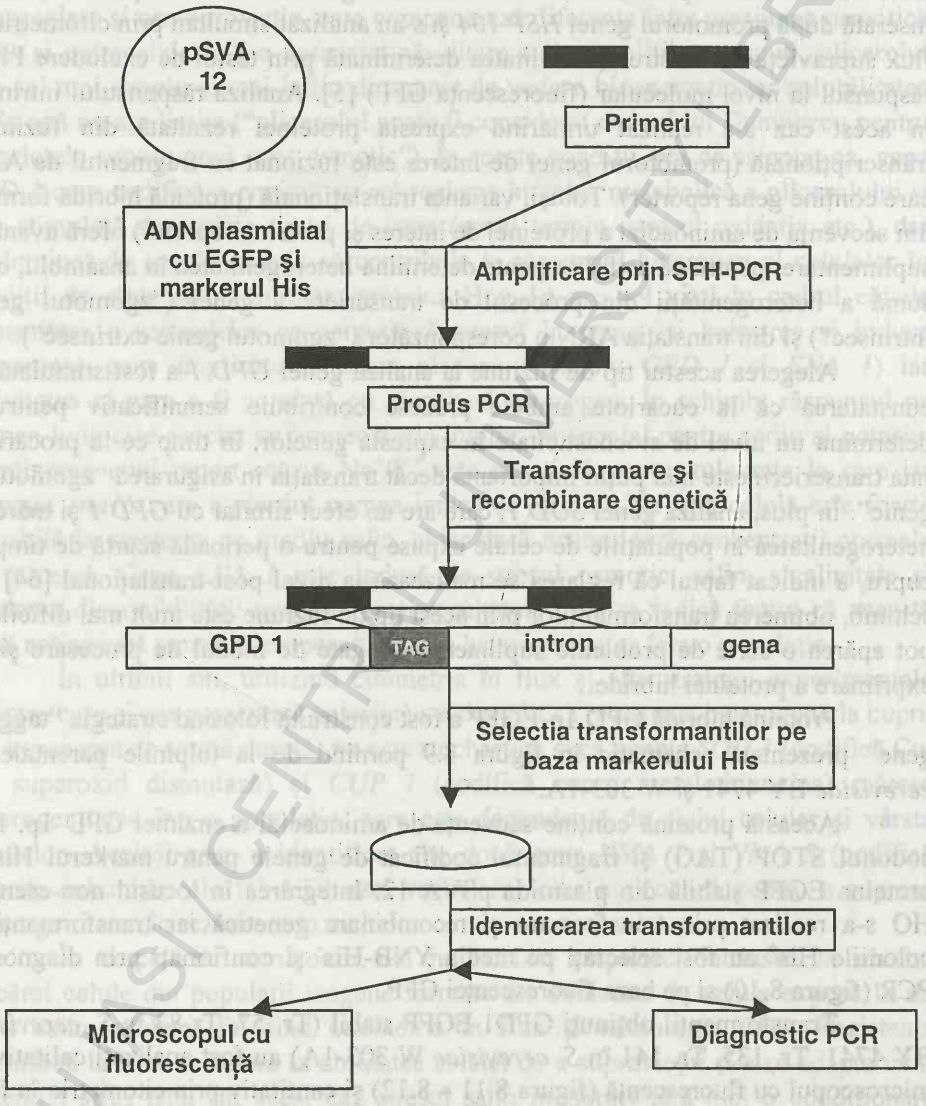


Figura 8.9. Strategia "tagging gene"

BCU ASE / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

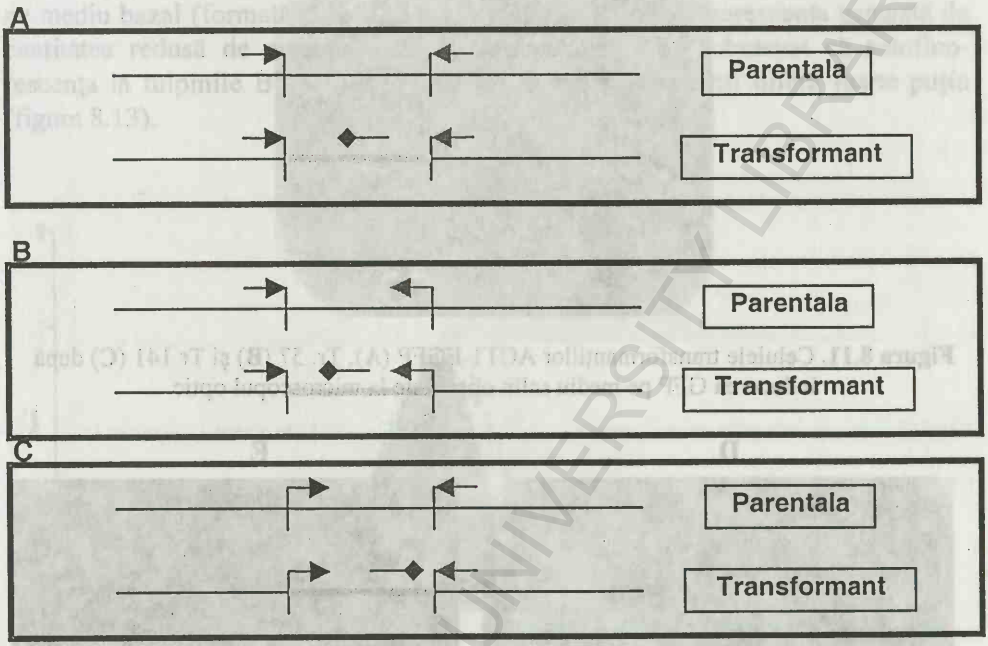
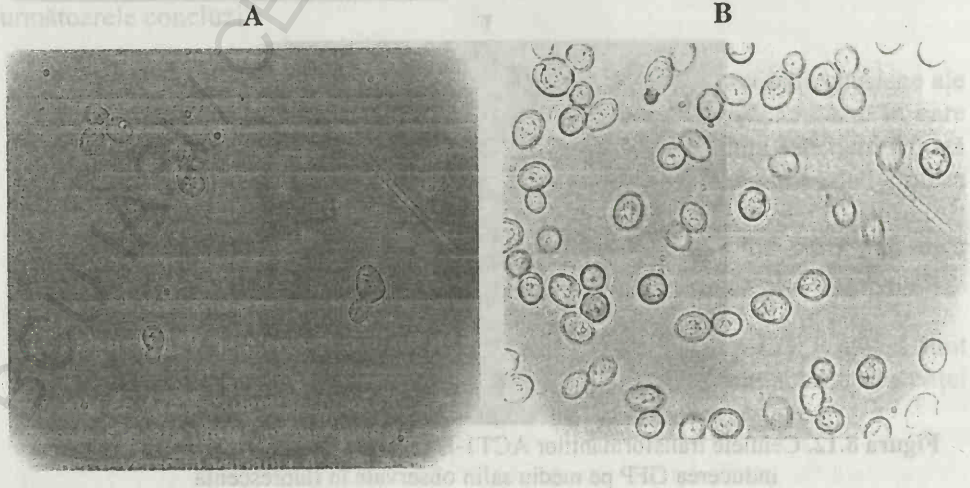


Figura 8.10. Strategia de design a primerilor pentru diagnostic PCR la fuziunea translațională GPD1-EGFP
Secvența de ADN exogen inserată - linia galbenă, primer forward - săgeata albastră, primer reverse - săgeata violet, primer pentru markerul His - săgeata roşie
(primer reverse în varianta A şi B, respectiv forward în varianta C)



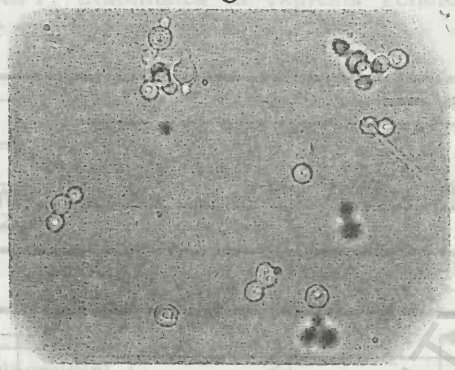


Figura 8.11. Celulele transformanţiilor ACT1-EGFP (A), Tr. 57 (B) şi Tr 141 (C) după inducerea GFP pe mediu salin observate la microscopul optic

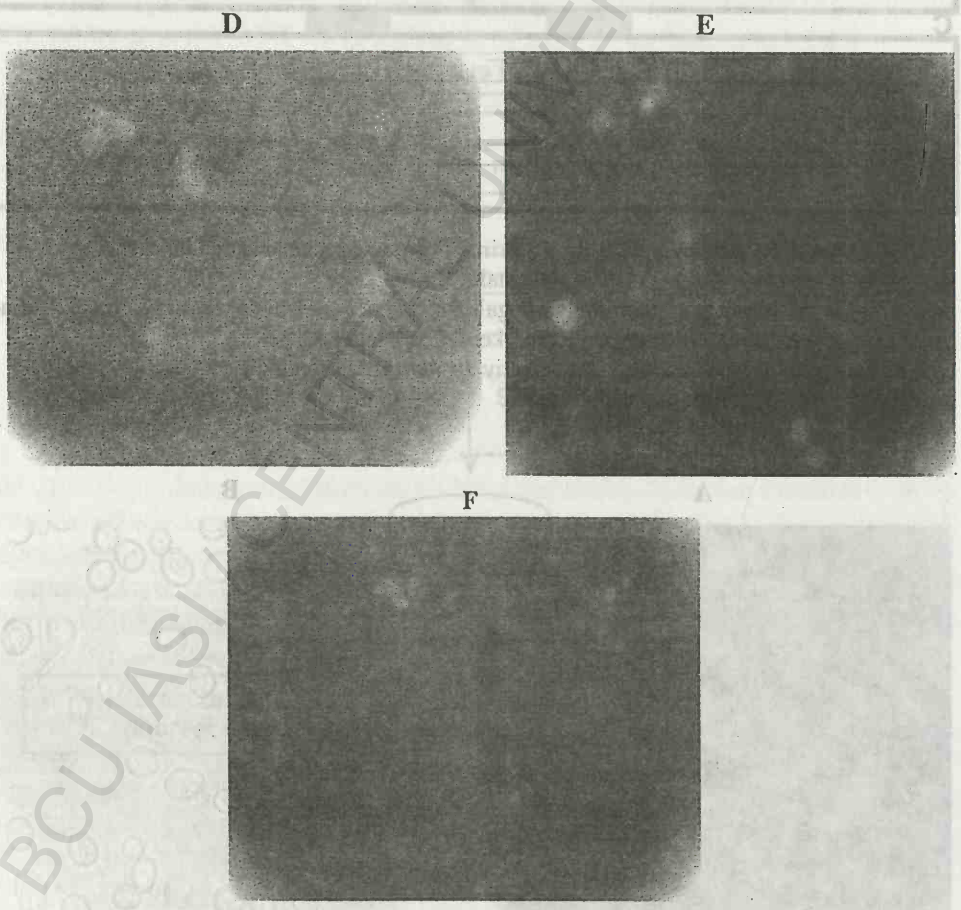


Figura 8.12. Celulele transformanţilor ACT1-EGFP (D), Tr. 57 (E) şi Tr 141 (F) după inducerea GFP pe mediu salin observate în fluorescenţă

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În prima fază s-au comparat curbele gausiene care prezintă autofluorescența la tulpinile parentale și graficele pentru fluorescență la transformanții crescuți pe mediu bazal (formată din autofluorescența celulei plus fluorescența generată de cantitatea redusă de enzimă GPD 1p intracelulară). S-a observat că autofluorescența la tulpinile BY 4741, W 303-1A și la transformanți diferă foarte puțin (figura 8.13).

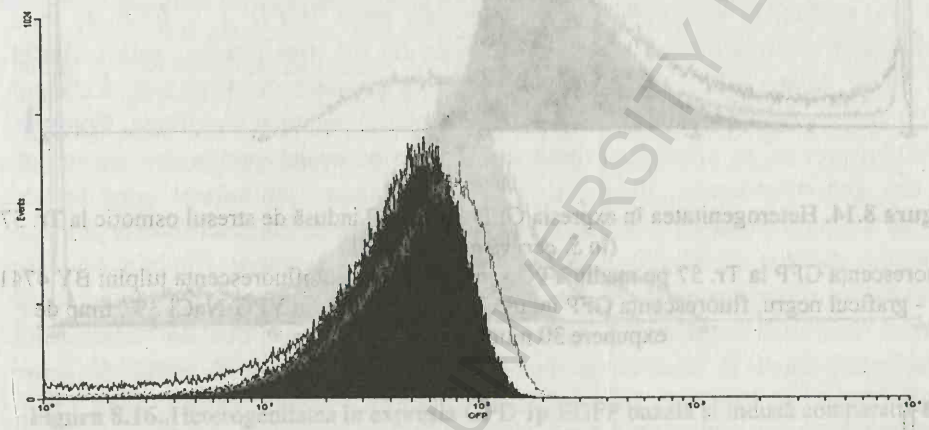


Figura 8.13. Autofluorescența la transformanții GPD1-EGFP
Transformanții în *S. cerevisiae* BY 4741: graficul roșu - Tr 57, graficul negru - Tr 83
Transformanții în S. cerevisiae W 303-1A: graficul verde - Tr. 135,
graficul albastru - Tr 141

Analiza graficelor (figurile 8.14 – 8.15) care prezintă autofluorescența și fluorescența GFP a transformanților crescuți pe mediu YPG și YPG-NaCl 3% oferă următoarele concluzii:

- are loc o creștere a intensității fluorescenței GFP iar curbele gausiene ale transformanților sunt deplasate spre dreapta, mai puțin în cazul în care celulele sunt crescute pe mediu bazal, unde fluorescența este determinată de cantitatea inițială de Gpd 1p intracelulară și mai mult când sinteza proteinei este indusă de stresul osmotic;
- se constată că doar o subpopulație de celule prezintă inducerea puternică a sintezei de GPD 1p în mediu cu 3% NaCl (al 2-lea peak), fapt remarcat si la microscopia cu fluorescență;
- graficele care reflectă modul de exprimare al GPD 1p-EGFP indusă sunt complet diferite (au 2 peak-uri) comparativ cu graficele autofluorescenței la celulele parentale/transformanților și mult mai heterogene.

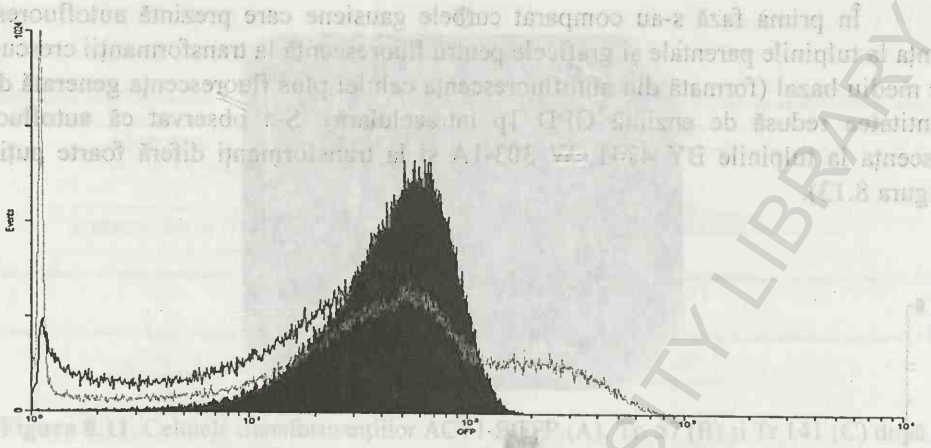


Figura 8.14. Heterogenitatea în expresia GPD 1p-EGFP indusă de stresul osmotic la Tr. 57 (în *S. cerevisiae* BY 4741)
Fluorescența GFP la Tr. 57 pe mediu YPG - graficul roşu, autofluorescența tulpini BY 4741 - graficul negru, fluorescența GFP indusă la Tr. 57 pe mediu YPG-NaCl 3%, timp de expunere 30 minute - graficul verde

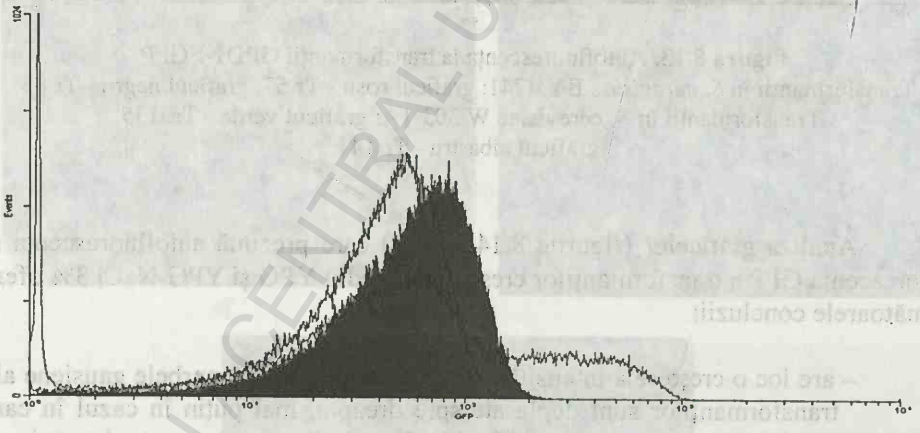


Figura 8.15. Heterogenitatea în expresia GPD 1p-EGFP indusă de stresul osmotic la Tr. 135 (în *S. cerevisiae* W 303-1A)
Fluorescența GFP la Tr. 135 pe mediu YPG - graficul roşu, autofluorescența tulpini W 301-1A - graficul negru, fluorescența GFP indusă la Tr. 135 pe mediu YPG-NaCl 3%, timp de expunere 30 minute - graficul albastru

Dacă inducere cu sare ar fi determinat o curba similară cu a fluorescenței bazale (chiar în condițiile în care intensitatea GFP era mai mare), acesta reprezenta o dovadă că heterogenitatea nu s-a modificat. Dar, curba obținută este complet diferită față de graficul fluorescenței GFP bazale şi cel al genei *ACT 1*. Totuşi,

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

curba gausiană a genei constitutive *ACT 1* (peak-ul al doilea) este similară cu curba fluorescenței la transformanții dezvoltați pe mediul bazal. În acest caz se poate aprecia că heterogenitate în exprimarea constitutivă a genelor *ACT 1* și *GPD 1* prezintă același nivel (figura 8.16).

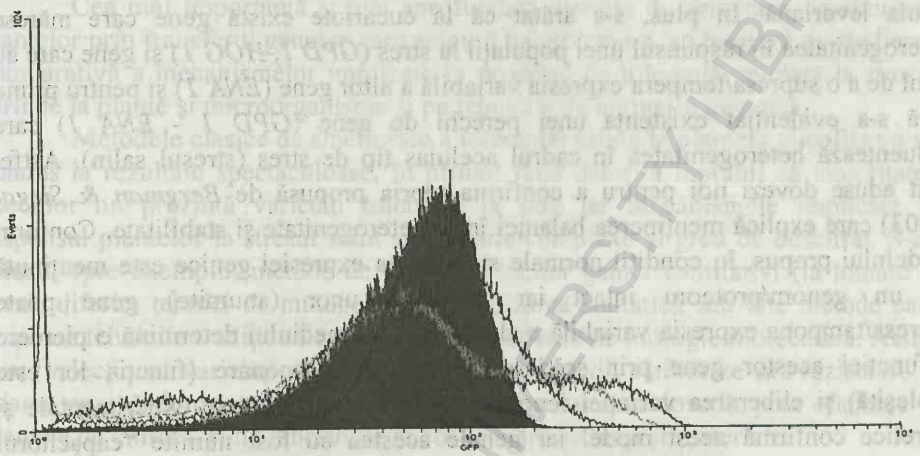


Figura 8.16. Heterogenitatea în expresia GPD 1p-EGFP bazală și indusă comparativ cu expresia genei ACT 1

Fluorescența GFP bazală la Tr. 135 pe mediu YPG - graficul roșu, fluorescența GFP la transformantul ACT1-EGFP - graficul negru, fluorescența GPD1-EGFP indusă la Tr. 57 - graficul verde, fluorescența GPD1-EGFP indusă la Tr. 135 - graficul albastru. Inducere pe mediu YPG-NaCl 3%, timp de 30 minute. Tr. 57 în *S. cerevisiae* BY 4741, Tr. 135 în *S. cerevisiae* W 303-1A

Din analiza comparativă a heterogenității în expresia genei care se exprimă constitutiv ACT1-EGFP și a proteinei induse GPD 1p-EGFP se constată faptul că răspunsul este mult mai heterogen la inducerea prin stres osmotic a enzimei glicerol-3-fosfat dehidrogenaza. Curba gausiană care reflectă heterogenitatea este mai împrăștiată (de la 10^1 - 10^3 GFP) decât curba ACT1-EGFP ori comparativ cu graficul autofluorescenței de la tulpinile parentale sau a fluorescenței GFP bazale la transformanți.

Analiza cantitativă totală a datelor (inclusiv valorile fluorescenței din domeniul 10^0 -10^1 deoarece graficul ACT1-EGFP prezintă un peak în această zonă) a furnizat pentru deviația standard valori de 46 la exprimarea genei *ACT 1* și 116,67 pentru exprimarea GPD 1p-EGFP la Tr. 57 (în tulpina BY 4741), respectiv 164,12 la Tr. 135 (în tulpina W 303-1A). Analiza coeficientului de variație, adică raportul între deviația standard și medie, indică o valoare de 6,33 pentru tulpina *S. cerevisiae* BY 4741, respectiv 7,2 pentru tulpina W 303-1A, adică o heterogenitate în expresia GPD 1p-EGFP de 2,5 - 3,56 ori mai mare decât în cazul ACT 1-EGFP.

În concluzie, experienţele realizate pe microorganismul-model eucariot *Saccharomyces cerevisiae* au dovedit faptul că rezistenţa heterogenă non-genetică la sare nu este stochastică, ci este determinată de activitatea/inducerea genei *GPD 1*, implicată în producerea şi reglarea sintezei de glicerol, cel mai important compus osmoreglator (atât din punct de vedere cantitativ, dar şi prin rolul său) în celula levuriană. In plus, s-a arătat că la eucariote există gene care măresc heterogenitatea în răspunsul unei populaţii la stres (*GPD 1*, *HOG 1*) şi gene care au rolul de a o supresa/tempera expresia variabilă a altor gene (*ENA 1*) şi pentru prima oară s-a evidenţiat existenţa unei perechi de gene (*GPD 1 - ENA 1*) care influenţează heterogenitatea în cadrul aceluiaş tip de stres (stresul salin). Astfel sunt aduse dovezi noi pentru a confirma teoria propusă de *Bergman & Siegal* (2003) care explică menţinerea balanţei între heterogenitate şi stabilitate. Conform modelului propus, în condiţii normale stabilitatea expresiei genice este menţinută de un genom/proteom intact iar produsul unor (anumite) gene poate supresa/tampona expresia variabilă a altora. Stresul mediului determină o pierdere a funcţiei acestor gene prin scăderea puterii de tamponare (funcţia lor este copleşită) şi eliberarea variaţiei fenotipice ascunse. Rezultatele experimentale şi teoretice confirmă acest model iar genele acestea au fost numite "capacitorul evoluţionar". Până în prezent au fost identificate doar câteva astfel de gene: proteina chaperon *Hsp 90* la *Drosophila* şi Arabidopsis, genele *VMA 1*, *VMA 3* care codifică diferite subunităţi ale ATPaze vacuolare şi *ENA 1* (cercetările continuă cu realizarea unui transformant GPD1-EGFP în mutanta *ena1*Δ) la *Saccharomyces cerevisiae*. Mecanismul de tamponare a genelor microbiene pare a fi parţial diferit de modelul propus pentru Hsp 90, care este o genă cu efect pleiotropic în organism, în timp ce *VMA 1/3* sunt gene vacuolare iar *ENA 1* este indusă puternic doar de stresul salin.

Plantele prezintă mecanisme de toleranţă la stresul salin similare cu fungi iar pe baza rezultatelor obţinute la microorganismul-model *Saccharomyces cerevisiae* şi în conformitate cu teoria lui *Bergman & Siegal* se poate bănui existenţa în plante a unei/unor perechi de gene care influenţează heterogenitate (de tipul *GPD 1 - ENA 1*) la stresul salin, gene asociate fie cu sinteza compuşilor osmoreglatori ori poate cu homeostazia ionilor, cu atât mai mult cu cât existenţa capacitorului evoluţionar *Hsp 90* a fost deja evidenţiată la *Arabidopsis* sp.. Modelul propus la plante permite elaborarea unei strategii de ameliorare a halotoleranţei bazată pe overexpresia genelor care măresc heterogenitatea şi blocarea genelor de tip capacitor evoluţionar. Strategia propusă ar permite izolarea unor plante mai rezistente la stres a căror analiza va determina înţelegerea mecanismelor ce asigură toleranţa mărită (chiar dacă aceste plante nu îşi transmit ereditar caracterele) şi/sau izolarea de noi osmo- halogene vegetale.

8.3. IMPORTANȚA UTILIZĂRII MODELELOR MICROBIENE PENTRU AMELIORAREA TOLERANȚEI PLANTELOR LA SALINITATE

Cea mai importantă şi mai aprofundată direcție de cercetare, ameliorarea plantelor prin transferul genelor care asigură halotoleranța, se bazează pe studierea comparativă a mecanismelor implicate în procesul de toleranță celulară la stresul sării de la plante şi microorganisme şi pe tehnicile de inginerie genetică.

Metodele clasice de ameliorare a toleranței saline la plantele glicofite nu au condus la rezultate spectaculoase, în primul rând datorită faptului că majoritatea speciilor nu prezintă varietăți tolerante la sare iar mecanismele implicate în răspunsul plantelor la stresul salin sunt foarte complexe şi greu de descifrat. S-au folosit, spre exemplu, metode de cartare a locilor genici cantitativi (la tomate şi orez), diferite tehnici de mutageneză, hibridizarea somatică sau alte metode care combină tehnicile tradiționale cu metodele moderne de biologie moleculară. Astfel s-au selecționat varietăți adaptate să crească pe medii sărăturate sau rezistente la udarea cu apă de mare. Totuşi, metodele clasice nu s-au dovedit prea eficiente la plantele de cultură, fiind laborioase şi costisitoare ca timp şi materiale.

În acest caz, ingineria genetică a halotoleranței este o alternativă viabilă, foarte avantajoasă şi eficientă, care permite într-un timp relativ scurt îmbunătățirea toleranței plantelor la sare prin manipularea unui număr mic de gene vegetale implicate în acest proces sau mai rapid prin transferul unor halo- şi osmogene de la microorganismele halofile/halotolerante la plantele superioare. Principala problemă în cadrul acestei aprofundări este reprezentată de izolarea genelor relevante pentru halotoleranță în scopul transferului lor, gene care pot fi componente ale procesului general de adaptare la plantele de cultură ori la halofite şi care prin overexpresie constitutivă în plantele transgenice îmbunătățesc toleranța la salinitate.

Strategia de ameliorare a plantelor prin transferul halo- şi osmogenelor microbinene poate fi divizată în cinci etape esențiale, începând cu etapele de selecție şi izolare a microorganismelor halotolerante/ halofile, identificarea şi caracterizarea genelor care asigură toleranța şi a mecanismelor implicate până la introducerea genelor în celulele plantelor şi studierea performanțelor realizate (figura 8.17).

Unul dintre punctele cheie, care poate garanta succesul unei astfel de strategii este reprezentat de transferul în celula vegetală a genelor care codifică enzime ce catalizează conversia substratelor care se găsesc în mod natural în plantă în produşi cu rol osmoreglator. Dar şi alte gene care codifică proteinele induse de stres (genele RAB) ori enzimele care apără celulele vegetale de efectele secundare ale stresului salin pot fi țintele logice pentru procesul de îmbunătățire a toleranței plantelor la salinitate.

Acumularea compuşilor osmoprotectori şi a osmoliților este principala metodă utilizată de plante în condiții de stres salin, dar modul de acumulare, cantitățile si tipul de osmoreglatori sintetizați diferă de la o specie la alta. Din acest

motiv, majoritatea tehnicilor de inginerie genetică s-au focalizat pe transferul osmogenelor microbiene la plantele superioare iar osmoliții au fost selectați astfel încât să asigure atât balanța osmotică, cât și stabilizarea membranelor și/sau a macromoleculelor structurale. A doua categorie de gene microbiene preferate în strategiile de ameliorare a toleranței plantelor este reprezentată de halogenele implicate în sistemul de transport a Na^+ prin membrana plasmatică și cele asociate cu procesul de compartimentare vacuolară. Această aprofundare se bazează pe constatarea că fungi și plantele superioare prezintă similarități între procesele de preluare a K^+ și sistemul de transport prin membrana plasmatică a Na^+ iar genele de la drojdii sînt conservate și se exprimă în plante.

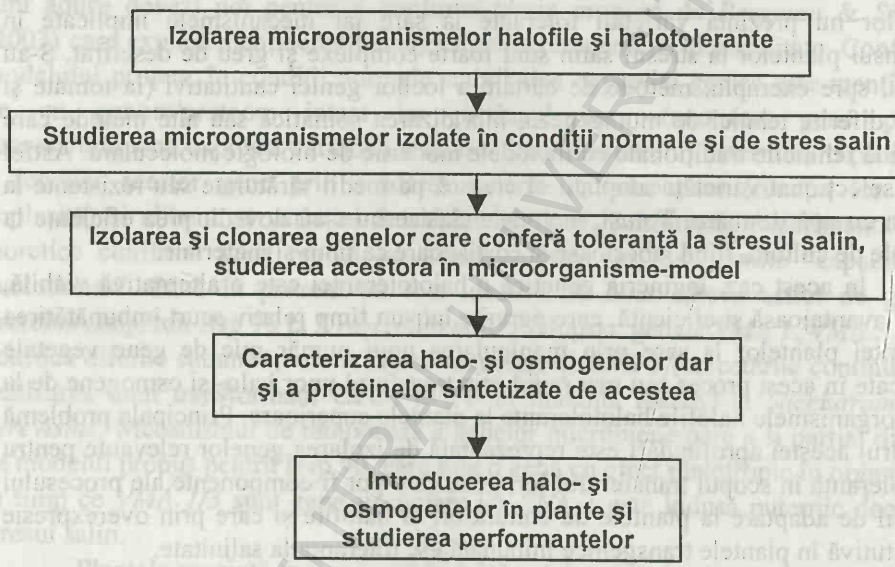


Figura 8.17. Strategia de obținere a plantelor transgenice prin transferul halo- și osmogenelor microbiene

Prezentăm în tabelul 8.4 principalele speciile microbiene, genele implicate în răspunsul la stresul salin clonate și plantele transgenice obținute.

Exprimarea genelor străine în plante poate genera o serie de modificări morfologice, fiziologice și biochimice, iar abilitatea de a depăși aceste obstacole este esențială pentru crearea plantelor tolerante la stresul salin. Printre cele mai importante probleme cu care se confruntă studiile de amelioare a plantelor la salinitate sunt:

- tehnicile de transformare sunt disponibile pentru majoritatea plantelor superioare, dar există și excepții;
- este esențial să se asigure expresia adecvată a genelor clonate deoarece modificările post-translaționale pot altera/neutraliza funcția proteinelor clonate;

- disponibilitatea precursorilor poate limita formarea produsului de interes;
- activitatea enzimelor endogene care pot inactiva proteinele clonate ori pot conduce la generarea unor produși toxici.

Tabelul 8.4.

Halo- și osmogene microbiene exprimate în plante transgenice

Tulpina microbiană	*Gena implicată în răspunsul la stresul salin*	*Planta transgenică*	*Bibliografie*
Escherichia coli	*BetA* - implicată în biosinteza de glicin-betainã	Tutun, cartof	*Lilius, G.*, 1996
E. coli	*BetA, BetB* - implicată în biosinteza de glicin-betainã	Tutun	*Holmstrom, K. O.*, 2000
E. coli	*Mltd* - implicată în biosinteza de manitol	*Arabidopsis*, tutun	*Thomas, J. C.*, 1995; *Tarczynski, M.*, 1993
E. coli (gene transferate de la *Marinococcus halophilus)*	*EctA, EctB, EctC* - implicate în biosinteza de ectoină	Tutun	*Rai, M.*, 1999
Bacillus subtilis	*SacB* - implicată în sinteza fructanului	Tutun	*Pilon-Smits, E.A.H.*, 1995
Arthrobacter globiformis	*CodA* - implicată în acumularea de glicin-betainã	*Arabidopsis thaliana, Brassica juncea*	*Hayashi, H.*, 1997; *Prasad, K.V.S.K*, 2000
Halomonas elongata	Genele *Ect* - implicate în biosinteza ectoinei	Cartof	*Ono, H.*, 1999
Rhizobium sp.	Genele *osm* (*pro A, pro B, pro C*) - implicate în biosinteza de prolinã	Tutun	*Dandekar, A. M.*, 1983
Saccharomyces cerevisiae	*TPS 1* - implicată în acumularea de trehaloză	*Arabidopsis* sp., tutun, cartof	*Holmstrom, K.O.*, 1996; *Holmstrom, K.O.*, 1996; *Serrano, R.*, 1999; *Yeo E.T.*, 2000
S. cerevisiae	*HAL 1* - implicată în homeostazia ionilor	*Arabidopsis* sp., tomate,	*Yang, S.X.*, 2001; *Gisbert, C. & Serrano,*

		Cucumis melo, Citrullus lanatus	*R.*, 2000; *Bordas, M. & Serrano, R.*, 1997; *Ellul, P. & Serrano, R.*, 2003
S. cerevisiae	*ENA 1* - implicată în homeostazia ionilor	Tutun	*Nakayama, H.*, 2004

8.3.1. Transferul genelor implicate în biosinteza prolinei

La foarte multe specii de plante acumularea prolinei este un indicator al nivelului de toleranţă la stresul salin. Acest aminoacid intervine în controlul osmotic, favorizează stabilitatea membranelor şi protejează unele enzime sensibile la prezenţa ionior toxici.

Primele cercetări în domeniu au pornit de la experimentele realizate de *LeRudulier* et al. (1982), care a remarcat faptul că plantele de lucernă supuse la o concentraţie de 0,2 M NaCl prezintă o inhibiţie puternică a procesului de fixare a azotului; în timp ce adăugarea în mediu de creştere a două substanţe: glicin-betaina/trimetilglicina (GB) şi dimetilprolina (DMP), în concentratie de 10 mM, a determinat o mărire a nivelului de fixare a azotului cu 35%, respectiv 22%. În experienţele realizate ulterior pentru a explica acest fenomen s-a observat că celulele de *Rhizobium meliloti* (ce realizează fixarea azotului la lucernă), în prezenţa celor două substanţe acumulează în citoplasmă compuşi cu rol osmoreglator. În plus, izolarea unor mutante superproducătoare de prolină de la *Rhizobium* sp., rezistente la stresul salin şi infectarea cu acestea a plantelor de soia a dovedit faptul că prolina sintetizată de tulpinile bacteriene are capacitatea de a intensifica fixarea N.

Rezultate similare au fost observate la *R. trifolii* (care fixează azotul la trifoi) şi la *Klebsiella* sp., ambele specii răspunzând la stresul salin prin acumularea de compuşi osmoreglatori de tipul prolină şi trimetilglicină.

Studiile realizate asupra fixării azotului la speciile de soia de către *Dandekar* et al. de la Universitatea din California (1983) au condus la izolarea unei tulpini bacteriene halotolerante de *R. japonicum*, care sintetizează prolina cu rol osmoreglator. Bacteria determină apariţia la nivelul rădăcinilor plantelor de soia a nodulilor ce conţin bacteroizii implicaţi în fixarea azotului atmosferic şi s-a dovedit a fi mult mai eficienta în fixarea N, decât alte tulpini bacteriene din aceasta specie. Aceasta proprietate a bacteriei notate *R. japonicum* USDA 191 este strâns legată de prezenţa în celulele microbiene a unei cantităţi mari de glutamat.

La toate tulpinile de *Rhizobium* sp. ionii de amoniu, principalul produs al reacţiei de fixare a azotului, sunt convertiţi la glutamat în două etape, catalizate de enzimele: glutamil-sintetaza GS (E.C. 6.3.1.2) şi L-glutamin-2-oxoglutarat GOGAT (E.C. 2.6.1.53). Glutamatul prezent în celulă (în general) sub formă de

sare de potasiu are şi el efect osmoreglator, dar este folosit mai ales la sinteza de prolină. Enzimele care catalizeaza calea de biosinteză a prolinei sunt:

- γ-glutamil-kinaza, produsul genei *proB*;
- γ-glutamil-fosfat-reductaza, produsul genei *proA*;
- Δ'-prolin-5-carboxilat reductaza, produsul genei *proC*.

Sinteza de prolină este reglată printr-un mecanism de feed-back negativ: prolina în cantitate mare determină inhibarea produsului genei *proB*. La tulpina mutantă, super-producătoare de prolină s-a constatat ca enzima γ-glutamil-kinaza este de 100 de ori mai puțin sensibilă la inhibarea negativă prin intermediul prolinei, motiv pentru care această substanță osmoreglatoare se acumulează în celulă.

Genele care codifică cele 3 enzime (genele *proA, proB şi proC*) au fost identificate şi clonate în plasmide, iar enzima γ-glutamil-kinaza a fost studiată din punct de vedere biochimic şi s-a constatat că este formată din două componente (fractia I şi II), ambele fiind necesare pentru funcționarea normală a enzimei. Operonul biosintetic al prolinei (genele *proA* şi *proB* sau genele *osm*) este reprezentat de un segment de ADN de 10,6 kb. Acesta a fost inserat la nivelul situsului pentru enzima de restricție EcoR1 din plasmida pBR322, rezultînd plasmida himera pLA101. Principalul avantaj al folosirii plasmidei pBR322 este legat de faptul că acest replicon se reproduce în multe copii în celulă şi poate genera astfel o mare cantitate de produşi ai genelor *osm* (mai ales pentru că promotorul genelor este constitutiv). Plasmida pLA101 se replica doar în *E. coli*, de aceea a fost necesară dezvoltarea unei strategii care să permita mărirea spectrului de gazdă al plasmidei şi posibilitatea de a transmite aceste gene la *Rhizobium* sp. În acest scop s-a folosit vectorul plasmidial pRK290, capabil să se replice la speciile de *Rhizobium* sp., la care au fost legate la nivelul situsul EcoR1, genele *osm* (izolate electroforetic în prealabil din plasmida pLA101). Molecula recombinantă hibridă rezultată, numită plasmida pJG137 poate funcționa ca vector shuttle atât pentru *E. coli*, cât şi pentru *Rhizobium* sp (figura 8.18).

Ulterior această plasmida a fost transferată şi la alte tulpini bacteriene utilizând un sistem de transfer tripartit, bazat pe fenomenul de conjugare, care presupune acțiunea a trei parteneri plasmidiali diferiți:

- plasmida donor pJG137, purtătorul genelor *osm*;
- plamida ajutătoare (helper), folosindu-se plasmida p2013;
- tulpina recipient, *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Alcaligenes eutrophus, R. meliloti, R. japonicum* USDA 110, 191.

Pentru a evidenția activitatea biologică a genelor *osm* şi efectul lor asupra fixării azotului la diverse leguminoase s-au folosit ulterior numeroase teste: evidențierea plasmidei şi a stabilității ei în tulpina plantă-donor, identificarea super-producției de prolină, analiza biochimică a enzimei γ-glutamil-kinaza şi analiza finală a fixării azotului în condiții de stres osmotic.

O serie de probleme au rămas încă nerezolvate, acestea referindu-se la costul energetic pe care planta trebuie să îl plătească pentru reglarea procesului de osmoreglare şi dacă cumva acest proces poate avea efecte adverse în dezvoltarea

plantei. Deasemenea, nu este încă bine cunoscut mecanismul prin care compuşii osmoprotectori (prolina în special) traversează membrana bacteroizilor şi care este numărul minim de bacteroizi necesari pentru a infecta o plantă.

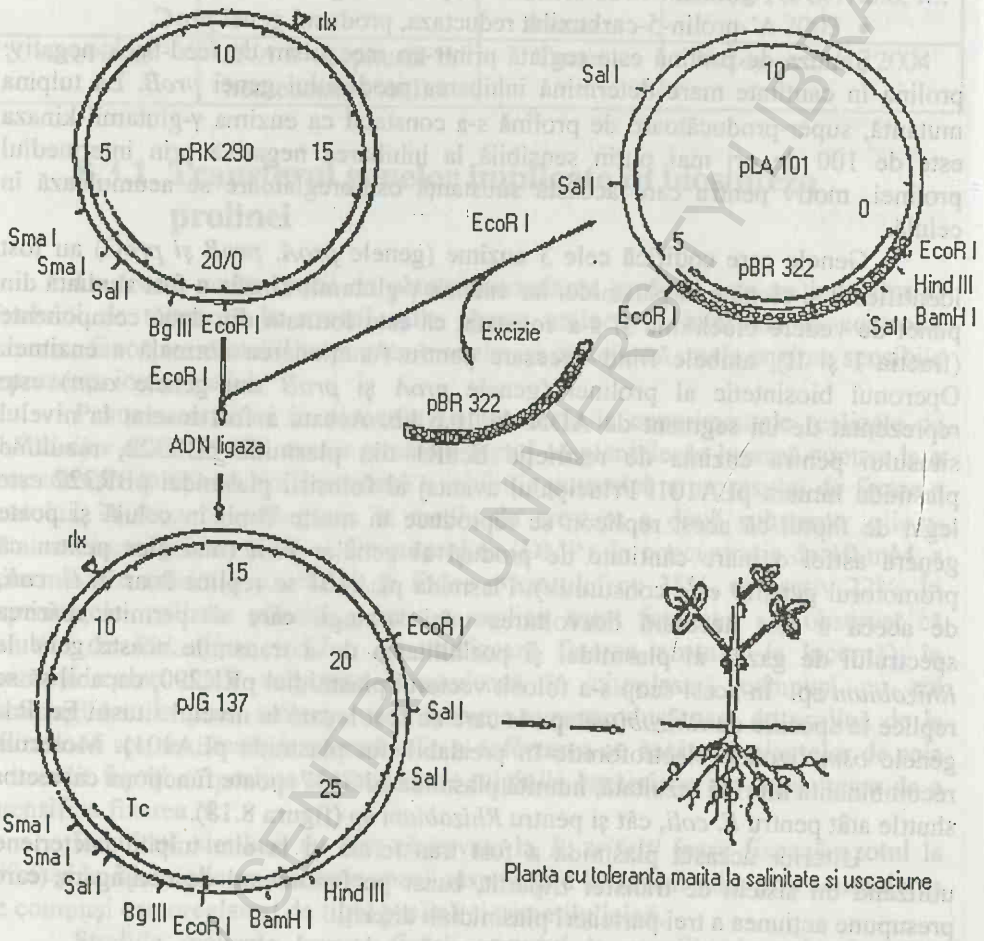


Figura 8.18. Strategia de transfer a genelor osm la plantele de soia folosind vectorii plasmidiali pLA101, pRK290 şi pJG137 (prelucrare după Dandekar et al., Plant Molecular Biology, pp. 277-289)

8.3.2. Transferul genelor implicate în biosinteza trimetilglicinei

Glicin-betaina/trimetilglicina este unul dintre compuşii care se acumulează la majoritatea plantelor supuse stresului salin sau secetei, în special la spanac,

bumbac, orez, cartof, tutun și sfecla de zahăr. Acest compus osmoreglator este însă prezent și la microorganisme: bacterii halofile, cianobacterii și alge.

Atât la procariote, cât și la eucariote glicin-betaina este produsă prin oxidarea colinei în două etape catalizate însă de enzime diferite. La plante calea de biosinteză a trimetilglicinei a fost descrisă la numeroase specii și implică acțiunea a două enzime: o monooxigenază (CMO) care oxidează colina la betain-aldehidă și dehidrogenază (BADH) care convertește betain-aldehida la glicin-betaină. Ambele enzime sunt localizate în cloroplaste, dar o mică activitate a enzimei BADH a fost găsită și în citoplasmă. La spanac și la sfecla de zahăr cele două enzime au fost clonate și secvențializate. La bacterii colina nu este sintetizată de către celulă, dar este transportată din mediu și este oxidată intracelular la betaină de către enzima colin dehidrogenaza CDH, care este apoi supusă acțiunii unei dehidrogenaze (BADH) și transformată în trimetilglicină. Ambele enzime, codificate de genele *betA* și respectiv *betB* au fost secvențializate și clonate.

Datorită acestei căi metabolice simple cele două gene de la *Escherichia coli* au fost transferate la plantele de tutun, la care s-a determinat acumularea de trimetilglicină și efectul pe care îl are acest compus osmoreglator asupra răspunsului plantelor transgenice la stresul termic și salin (figura 8.19).

Plantele la care a fost transferată gena care codifică CDH acumulează în celulă glicin-betaină, la fel ca plantele hibride din prima generație (F_1) rezultate din încrucișarea liniilor producătoare de CDH (linia *bet A* - 168) și BADH (linia *bet B* - 405). Pe baza analizelor cu ^{1}H-NMR și SDS-PAGE s-a constatat că organismele transgenice CDH - BADH (linia 168 x 405) acumulează cantități superioare de trimetilglicină comparativ cu liniile transgenice ce conțin doar enzima CDH, în care predomină sinteza de betaină. În plus, s-a remarcat faptul că plantele transgenice duble de tutun prezintă în condiții de seră toleranță mărită la stresul salin și la temperaturi scăzute și o descreștere a susceptibilități la fotoinhibiție, datorate rolului protector al glicin-betainei asupra fotosistemului II (PS II). In condiții de lumină puternică (390 μmol m^{-2} s^{-1}) și stres salin (200 mM NaCl) liniile transgenice care produc glicin-betaină prezintă o fotoinhibiție de 25%, în timp ce la plantele din lotul martor inhibiția a fost de aproximativ 35%. Totuși, acest fenomen nu s-a observat la expunerea timp de 7 ore în lumină ușoară (30 μmol m^{-2} s^{-1}), constatare care confirmă ipoteza că tratamentul cu sare nu afectează direct sistemul PS II. Intre liniile producătoare de CDH sau BADH și liniile transgenice duble nu există o diferență semnificativă din punct de vedere statistic în ce privește fotoinhibiția și recuperarea după aceasta impusă de stresul salin și lumina puternică.

Rezultate similare au fost obținute prin transferul genelor *bet* la *Arabidopsis* sp., dar în acest caz salinitatea nu afectează activitatea sistemului PS II, doar în combinație cu prezența unei iluminări puternice și de durată.

Totuși, în alte studii realizate la *Brassica rapa* s-a remarcat faptul că prezența unei cantități relativ mari de trimetilglicină în celule (30 - 1000 μmoli/g DW, comparativ cu cantitatea prezentă la plantele trangenice de tutun 40 - 80

nmol/g FW) are efect negativ asupra plantelor, atât la nivelul germinării semințelor, cât și asupra procesului de producere a semințelor.

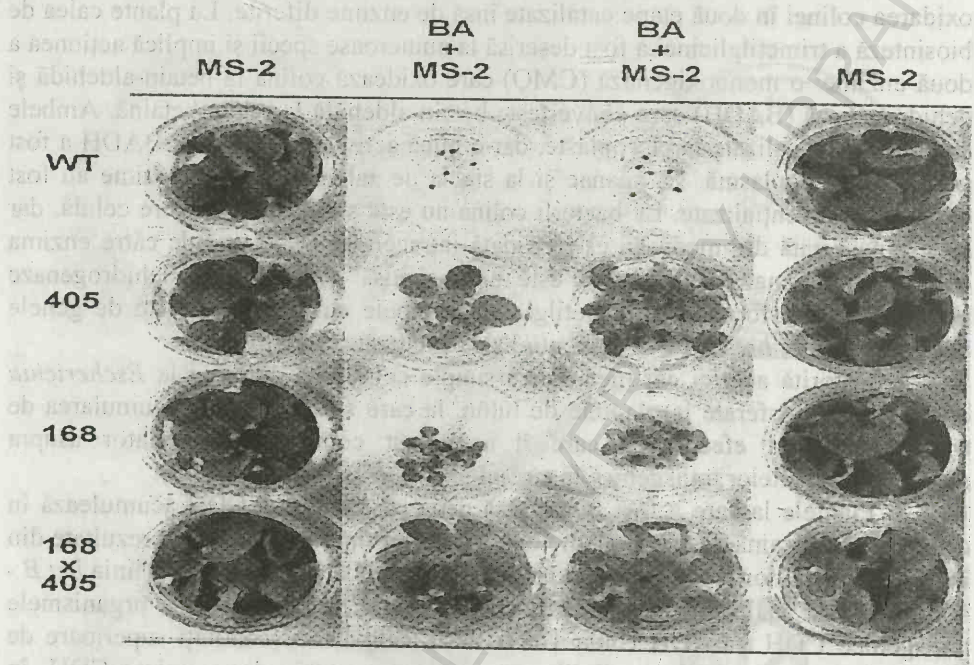


Figura 8.19. Plantele transgenice de tutun care exprimă genele implicate în biosinteza trimetilglicinei bacteriene
Plantele au fost crescute pe mediul MS - 2 suplimentat cu 0 - 10 mM glicin-betaină (BA). Liniile transgenice de tutun: WT - linia de control, plante netransformate; linia 405 - plante la care a fost transferată gena betB (care codifică BADH); linia 168 - plante la care a fost transferată gena betA (care codifică CDH); linia 168 x 405 - linie transgenică dublă (Holmstrom, K.O. et al., Plant J., 6(5), pp. 749-758, 1994)

8.3.3. Transferul genelor implicate în biosinteza trehalozei

Trehaloza se acumulează la un număr mare de organisme ca răspuns la diferite condiții de stres. In celulele de *Saccharomyces cerevisiae* sinteza și acumularea acestui compus osmoreglator a fost corelată cu termotoleranța, rezistența la stresul osmotic și la frig. În condiții de stres salin plantele superioare sintetizează preferențial zaharoză și în cantități mult mai mici trehaloză. Prezența trehalozei în cantități apreciabile a fost observată la unele angiosperme rezistente la deshidratare, fiind asociată cu ajustarea osmotică și rezistența la secetă .

Gena *TPS 1*, care codifică enzima trehaloza-6-fosfat sintaza din calea de sinteză a trehalozei la drojdii, a fost clonată în celulele de *Arabidopsis thaliana* și

Nicotiana tabacum prin transfer mediat de *Agrobacterium* sp. Această enzimă are în celula levuriană un rol dublu, de proteină implicată într-o cale metabolică şi un rol reglator, de control al influxului de carbohidraţi şi în inducerea semnalelor pentru inițierea glicolizei. Transferul genei *TPS 1* la tutun a fost realizat de două echipe diferite, de la Universitatea de Stiințe Agricole din Uppsala respectiv Universitatea Politehnică din Valencia, care au obținut plante transgenice cu dublă rezistență la salinitate şi la secetă.

În plantele transgenice de *N. tabacum* trehaloza a fost identificată prin metode cromatografice şi se acumulează în cantitate de 0,8 - 3,2 mg/g substanță uscată (în frunze), mult mai mare decât cantitatea de trehaloză din plantele martor 0,06 mg/g. Acest proces nu este dependent de faza de dezvoltare a plantei iar concentrați similare de trehaloză au fost izolate în frunzele plantelor tinere şi ale celor bătrâne din generația F1. In schimb, s-a constatat că sinteza trehalozei afectează căile metabolice şi hormonale ale plantei şi în primul rând metabolismul carbohidraților. Cantitățile de zaharoză şi glucoză din liniile transgenice care exprimă *TPS 1* sunt reduse cu 50% comparativ cu plantele din lotul de control.

Acumularea de trehaloză nu produce modificări fiziologice evidente la nivelul întregii plante, dar reduce rata de creştere în condiții optime cu 30 - 50%, comparativ cu creştere plantelor martor. În plus, o fracție mare de plante transgenice din F0 (40%) au prezentat diferite schimbări fenotipice, cum ar fi: frunze lanceolate, oprirea prematură a creşteri, în timp ce la unele s-a observat pierderea sterilității. In condiții de deshidratare, toate simptomele asociate cu acest proces au fost atenuate în plantele transgenice de tutun, deşi au apărut şi plante cu diferite schimbări morfologice. Aceste fenotipuri alterate au fost întotdeauna corelate cu toleranța la stresul apei, iar plantele care prezentau alterările cele mai severe au avut rezistență mărită la stresul salin şi la secetă comparativ cu celelalte plante transgenice (figura 8.20).

Concentrația de trehaloză din plantele transgenice este de 5 - 10 ori mai mică comparativ cu cantitățile de manitol şi prolină acumulate în liniile transgenice care exprimă aceste gene microbiene, deşi efectul este similar. In plus, organismele transgenice care conțin gena *TPS 1* au produs trehaloză utilizând pentru calea metabolică de biosinteză o fosfatază endogenă, fapt care nu a mai făcut necesară transferul şi a genei microbiene *TPS 2*.

O altă genă implicată în sinteza compuşilor osmoreglatori la eucariotele inferioare, gena *GPD* care codifică gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza de la ciuperca *Pleurotus sajor-caju* a fost transferată la drojdii şi la cartof. Transformanții obținuți, atât de la microorganisme cât şi de la plante au prezentat rezistență mărită la stresul abiotic (salinitate, secetă, frig şi temperaturi ridicate) datorită faptului că gena *GPD* este exprimată în permanență, în condiții normale şi de stres.

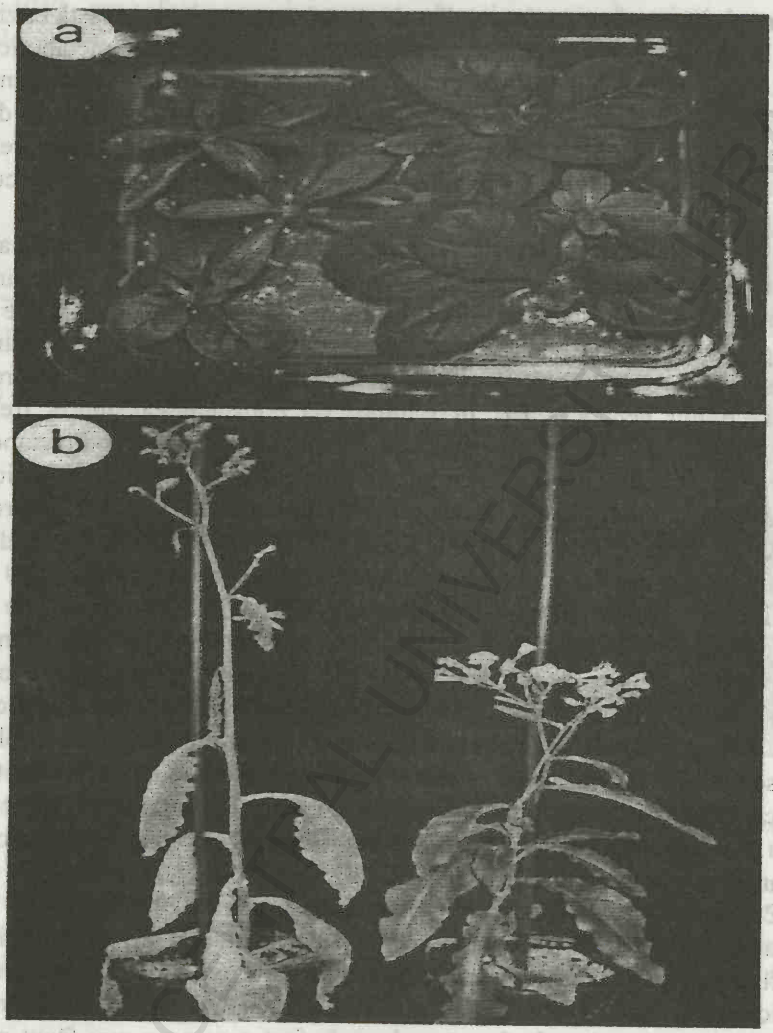


Figura 8.20. Plante transgenice de tutun care exprimă gena levuriană TPS 1 implicată în biosinteza trehalozei

a - Linii transgenice din generația F1 care conțin o singură copie a genei TPS 1, o parte dintre ele prezintă fenotip normal, în timp ce altele au alterări morfologice de tipul frunzelor lanceolate. b - Plante din lotul de control (stânga) și organisme transgenice TPS 1 din generația F1 cu frunze lanceolate (dreapta) după 15 zile de stres al apei (Romero, C. et al., Planta, **201**, pp. 293-297, 1997)

8.3.4. Transferul genelor implicate în homeostazia ionilor

Gena *HAL 1* a fost izolată inițial în cadrul unui program de screening a genelor care prin overexpresie măresc rezistența drojdiilor la stresul salin. Proteina citoplasmatică solubilă Hal 1p are rol reglator în homeostazia ionilor de sodiu și potasiu iar în condiții de overexpresie menține o concentrație intracelulară mare de K^+ și un nivel scăzut de Na^+, efect care permite îmbunătățirea toleranței la salinitate.

Echipa condusă de Serrano et al. (1999) de la Universitatea Politehnică din Valencia au reușit transferul acestei halogene la pepene și tomate. La *Cucumis melo* frecvența de obținere a transformanților folosind o metodă de transfer mediată de *Agrobacterium* sp. a fost scăzută, de 1,3% în cazul transformării celulelor din frunze și 3% la utilizarea cotiledoanelor. Totuși, plantele transgenice de *A. thaliana* și *Cucumis melo* obținute au fost crescute pe mediu cu 10 g/l NaCl fără să prezinte alterări fenotipice deși creșterea vegetativă și a rădăcinii este redusă. La *Lycopersicon esculentum* transferul genei *HAL 1* a îmbunătățit toleranța plantelor expuse la un stres salin sever de 150 mM sare, dar nu a avut același efect în condiții de salinitate moderată (75 mM NaCl). La concentrația de 150 mM plantele martor au prezentat o reducere a dezvoltării cu 52%, în timp ce la plantele transgenice creșterea a fost redusă doar cu 3%. Plantele transgenice de tomate udate 15 - 30 de zile cu apă care conține ioni de sodiu și potasiu au acumulat Na^+ în frunze și rădăcini, în concentrații mult mai mici decât plantele din lotul de control. Gena *HAL 1* a fost transferată și la *Citrullus lanatus* folosindu-se un protocol optimizat bazat pe transferul mediat de *Agrobacterium* sp. și explante de cotiledoane. Eficiența transformării a fost redusă 2,8 - 5,3% iar expresia genei clonate a fost identificată prin analiza Northern și citometrie în flux. Plantele transgenice obținute au fost testate în sisteme semi-hidroponice pentru a urmări dezvoltarea lor la salinitate de EC = 6 ds/m.

Altă genă implicată în homeostazia ionilor la *S. cerevisiae* (*ENA 1*) a fost clonată în culturi de celule vegetale iar plantele de tutun obținute au prezentat toleranță mărită la sare. în plus, s-a dovedit faptul că Ena 1p își păstrează funcțiile în celula vegetală și intervine în homeostazia alcali-cationilor, în mod similar cu cel remarcat la drojdii.

8.4. INGINERIA GENETICA A HALOTOLERANTEI LA PLANTE - CONCLUZII SI PERSPECTIVE

Primele experiențe de inginerie genetică care urmăreau îmbunătățirea toleranței plantelor la stresul salin au început în anii '80, dar succese remarcabile s-au obținut doar în ultima perioadă. Această relativă întârziere în obținerea rezultatelor

este consecința faptului că toleranța la sare în eucariote este un proces complex, care implică activarea a numeroase căi metabolice și mecanismele celulare de răspuns la stresul salin. Din acest motiv, în ultimii ani a apărut o nouă viziune asupra modului în care se pot izola genele halotoleranței (halo- și osmogene), s-au inventat noi strategii de obținere a plantelor transgenice halotolerante și s-au cercetat noi domenii de interes, cum ar fi heterogenitatea fenotipică.

Conform acestei aprofundări, toleranța la sare, ca și alte fenomene biologice, poate fi considerată rezultatul final al unui proces cu mai multe etape succesive, în care sunt implicați numeroși factori cu rol pozitiv sau negativ (la fel ca în cazul căilor metabolice). Fiecare etapă este importantă dar există și puncte/etape cheie ("bottle necks"), care corespund genelor halotoleranței și care trebuie să fie ținta preferențială pentru experimentele de inginerie genetică. Pierderea funcției în orice etapă determină întreruperea căi și pierderea toleranței, cu excepția cazurilor în care apare redundanța genică; în timp ce overexpresia în etapele cheie asigură îmbunătățirea toleranței la sare. Această strategie "gain of function" permite identificarea cu precizie a punctelor cheie care corespund genelor halotoleranței, care în overexpresie generează fenotipuri cu toleranță mărită la sare iar la pierderea genei produc fenotipuri cu sensibilitate ridicată la salinitate (figura 8.21).

Dar există și alte metode de identificare a genelor halotoleranței: analiza genetică clasică, "activation tagging" - inserția randomică a unor transcripte din genomul plantelor, clonarea genelor prin complementaritate cu fenotipul dorit pentu că aceste gene sunt conservate în evoluție.

Un scrutin asupra proceselor celulare implicate în toleranța și adaptarea microorganismelor și plantelor la salinitate sugerează faptul că genele halotoleranței corespund cu componentele catalitice sau reglatorii ale unor răspunsuri defensive de importanță crucială pentru celulă (transportul și compartimentarea ionilor monovalenți, protecția celulară împotriva stresului apei, sinteza osmoliților, răspunsul oxidativ etc.) sau procese metabolice foarte sensibile la stresul salin (sinteza și procesarea proteinelor, metabolismul energetic).

La *Saccharomyces cerevisiae* genele halotoleranței, identificate prin overexpresie, au fost clasificate în funcție de rolul lor în trei categorii: transportori de ioni (*ENA 1*), gene reglatoare implicate în transportul ionilor (*CRZ 1, MSN 3, HAL 1, HAL 3, HAL 4,5, HAL 9, CIN 5, YAP 6*) și gene-țintă pentru toxicitatea ionilor (*HAL 2/MET 22, URA 5*). În plante, genele halotoleranței identificate prin exprimare în sisteme-model levuriene, corespund proteinelor implicate în procesarea ARN, în efectul antioxidant ori sînt gene-țintă pentru toxicitatea ionilor (tabelul 8.5).

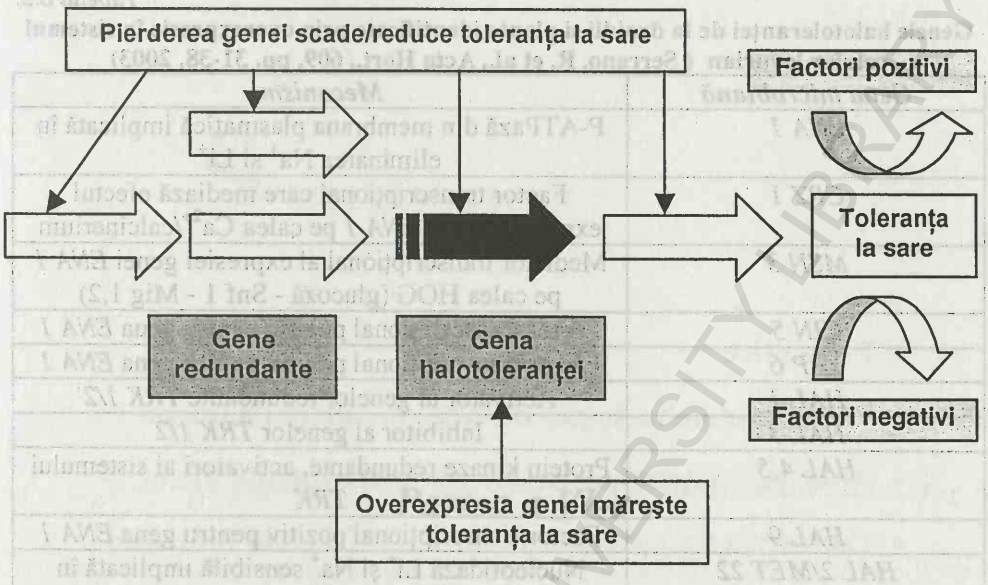


Figura 8.21. Strategia "gain of function" de identificare a genelor halotoleranței la drojdii și plante
(prelucrare după Serrano, R. et al., Acta Hort., **609**, pp. 31-38, 2003)

Într-o altă perspectivă studiile de amelioare a toleranței plantelor la sare sunt direcționate spre introducerea în plante a genelor microbiene implicate în diverse răspunsuri generate de stresul salin. Spre exemplu, genele pentru diferite molecule cu rol osmoprotector ori osmoreglator pot fi asociate cu genele care codifică proteine pentru transportul ionilor și/sau cu enzimele implicate în stresul oxidativ, considerându-se că acestea vor funcționa într-o manieră aditivă și vor permite obținerea unor plante cu toleranță mărită la stresul abiotic, în special la stresul de tip salin. Acest obiectiv poate fi realizat fie prin transformarea mai multor gene într-o singură plantă ori prin încrucișarea organismelor transgenice care conțin diferite gene ale halotoleranței și selecția liniilor ameliorate. Indiferent de strategia folosită, multi-transformarea cu 3 - 6 gene în același T-ADN și ameliorarea generează o serie de probleme ulterioare legate de: natura promotorilor care pot fi utilizați, controlul nivelului și a timpului de exprimare al genelor transferate, disponibilitatea precursorilor pentru fiecare din enzimele clonate care este dependentă de localizarea lor celulară, perturbările în rețeaua metabolică a plantelor generate de noile proteine clonate etc.

Tabelul 8.5.

Genele halotoleranței de la drojdii și plante identificate prin overexpresie în sistemul celular levurian (Serrano, R. et al., Acta Hort., 609, pp. 31-38, 2003)

Gena microbiană	*Mecanism*	
ENA 1	P-ATPază din membrana plasmatică implicată în eliminarea Na^+ si Li^+	
CRZ 1	Factor transcripțional care mediază efectul expresiei genei *ENA 1* pe calea Ca^{2+}/calcinerium	
MSN 3	Mediator transcripțional al expresiei genei *ENA 1* pe calea HOG (glucoză - Snf 1 - Mig 1,2)	
CIN 5	Factor transcripțional pozitiv pentru gena *ENA 1*	
YAP 6	Factor transcripțional pozitiv pentru gena *ENA 1*	
HAL 1	Activator al genelor redundante *TRK 1/2*	
HAL 3	Inhibitor al genelor *TRK 1/2*	
HAL 4,5	Protein kinaze redundante, activatori ai sistemului *TRK*	
HAL 9	Factor transcripțional pozitiv pentru gena *ENA 1*	
HAL 2/MET 22	Nucleotidază Li^+ şi Na^+ sensibilă implicată în biosinteza metioninei	
URA 5	Proteină implicată în biosinteza uracilului	
Gena la plante	***Mecanism***	
Arabidopsis sp. *AtRCY 1*	Proteine identificate în mutanta levuriană ena1Δ, implicate în procesarea proteinelor	
Arabidopsis sp. *AtSRL 1*		
Arabidopsis sp. *AtU1A*		
Beta vulgaris BvSATO 1-7	Proteine identificate în mutanta levuriană ena1Δ	Proteine de legarea a ARN
Beta vulgaris BvU2AF		Proteină U2snRNP AF
Beta vulgaris BvCK2á		Subunitatea catalitică a casein kinazei 2
Beta vulgaris BvURA4		Proteina omoloagă cu Ura 4p de la levuri
Beta vulgaris BvIF1A		Factor implicat în inițierea translației
Beta vulgaris BvAPX1	Proteine identificate în mutanta levuriană gpd1Δ	Ascorbat peroxidaza
Beta vulgaris BvSAT1		Serin acetiltransferaza

Evident, producerea prin metode biotehnologice a plantelor transgenice halotolerante este doar la începuturi, dar odată cu crearea unei imagini panoramice clare asupra mecanismelor care asigură halotoleranța şi prin îmbunătățirea tehnicilor de inginerie genetică se preconizează că în deceniile următoare se vor obține plante de cultură tolerante la sare şi uscăciune, atât de necesare în regiunile aride şi semiaride şi în zonele afectate de irigările intense, cum ar fi cele din bazinul Mediteranei.

Partea a VI-a

APLICAȚII ALE BIOTEHNOLOGIEI ÎN DIFERITE DOMENII

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- **Probiotice**
- **Produse biotehnologice utilizate în nutriția animală**
- **Aplicații biotehnologice ale enzimelor proteolitice**
- **Conversia materialelor lignocelulozice prin hidroliza enzimatică și fermentație**
- **Biotehnologii agroalimentare**
- **Aplicații ale biotehnologiilor în domeniul agroalimentar**
- **Aplicații ale biotehnologiilor în agricultură**
- **Toxicologia în biotehnologii**

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

9 PROBIOTICE

9.1. GENERALITĂȚI ASUPRA PROBIOTICELOR

Industria alimentară în general şi cea din Statele Unite în special (N.B. una dintre cele mai mari din lume), include următoarele priorităţi:

► mărirea eficienţei proceselor şi protejarea mediului înconjurător;

► extinderea şi dezvoltarea unor tehnologii complementare eficiente;

► evaluarea componentelor care acţionează în sistemul alimentar implementat;

► stabilirea de strategii de control şi efectuarea de studii ale degradării alimentelor;

► dezvoltarea continuă a producerii alimentelor cu efect benefic asupra stării de sănătate a omului.

Industria alimentelor funcţionale şi a probioticelor se extinde considerabil dând naştere la noi domenii prioritare. Pot fi amintite aici alimentele funcţionale naturale ca sucul de merişor, ceaiul verde etc, ingredientele alimentare FOSHU (*Food and ingredients for specific health use*), reţetele pentru copii şi bătrîni, alimentele medicale, produsele farmaceutico-nutriţionale (*nutraceutical*) şi medicamentele. În această catalogare şi schimbare a denumirilor, între „medicament" şi „aliment", există în aparenţă un număr mare de nişe pentru expansiunea sistemelor alimentare care fac reclamă la o nutriţie optimă şi sănătoasă. În aceste condiţii, alimentelor viitorului li se acordă o atenţie deosebită privind protecţia, conservarea şi bioprocesarea probioticelor.

În prezent, consumatorii apreciază alimentele atât după valoarea lor nutritivă, cît şi după capacitatea lor de a îmbunătăţi starea de sănătate a individului.

Alimentele funcţionale au devenit un segment important în continuă dezvoltare a pieţei de desfacere întrucît producătorii de alimente preambalate evidenţiază în mod egal şi valoarea nutrirvă a ingredientelor funcţionale din produsele lor. S-au extins studiile privind influenţa alimentelor asupra

consumatorilor, alimentele funcţionale avînd drept ţintă îmbunătăţirea activităţii tractului gastro-intestinal.

Încă din 1907, când Metchnikoff a considerat iaurtul un aliment benefic, acesta se foloseşte în alimentaţie cu scopul îmbogăţirii tractului gastro-intestinal cu bacterii lactice. Bacteriile de acest tip au fost denumite „probiotice" (Fuller 1989, Salminen ş.a., 1998), fiind selectate începând de atunci tulpini predominant din genurile *Lactobacillus* şi *Bifidobacterium*, care fac parte din microbiota normală a mucoasei intestinului uman. Tulpinile selectate au supravieţuit tranzitului intestinal şi au avut efect pozitiv asupra activităţii microbiotei intestinale şi, indirect, asupra sănătăţii gazdei. Datorită efectului benefic asupra omului, bacteriile în cauză, în particular cele din produsele lactate de tip iaurt sau lapte fermentat, au fost denumite „ingrediente funcţionale".

Substanţele *prebiotice* sunt incluse în strategia secundară privind îmbunătăţirea balanţei bacteriilor intestinale. Mai precis, prin introducerea unor tulpini „probiotice" exogene în tractul intestinal, prebioticele stimulează selectiv proliferarea şi / sau activitatea metabolică a unei grupe de bacterii preexistente în microbiota intestinală.

Prebioticele sunt ingrediente alimentare nedigerabile, care ajung în colon nemodificate, unde pot fi fermentate preferenţial de un grup de bacterii benefice. Până acum, prebioticele au fost considerate oligoglucide nedigerabile, care determină proliferarea tulpinilor de *Bifidobacterium* la om şi animale. Există un „potenţial sinergic" evident între prebiotice şi probiotice. Întrucît alimentele conţin atît prebiotice cît şi probiotice, acestea au fost denumite ingrediente „simbiotice" (Gibson şi Roberfroid 1995).

9.1.1. Mecanismul de acţiune

Bacteriile lactice (BL) metabolizează glucidele cu producere de acid lactic şi acizi graşi cu lanţ scurt (AGLS). Iaurtul se obţine prin fermentarea laptelui cu *Lactobacillus (L.) bulgaricus,* iar legumele sunt fermentate cu tulpini de *L. plantarum şi L. acidophilus.*

La prepararea iaurtului se adaugă adesea bifidobacterii, datorită capacităţii acestora de a coloniza mucoasa colonului uman.

În colon există 400-500 specii bacteriene, atât benefice, ca bacteriile lactice, cât şi specii condiţionat-patogene aparţinând genului *Clostridium.* Bacteriile benefice sunt indigene sau rezidente ale tractului gastro-intestinal (TGI). Colonizarea bacteriană a TGI neonatal începe în timpul naşterii, când nou-născutul vine în contact cu cervixul matern şi microbiota vaginală şi este colonizat cu *E. coli,* specie rapid înlocuită cu *Bifidobacterium bifidum* provenit din laptele de mamă. La copiii născuţi prin cezariană, bacteriile colonizatoare ale TGI provin din mediu. Primele bacterii prezente la majoritatea copiilor sănătoşi, sunt facultativ anaerobe şi acestea rămân predominante în timpul primelor două săptămâni de

viață. Speciile cele mai comune izolate din microbiota nou-născutului la naștere, aparțin genurilor: *Staphylococcus, Corynebacterium, Propionibacterium* și *Streptococcus.* Alimentația pare să moduleze *pattern*-ul de colonizare. La om, laptele matern joacă un rol în imunitatea pasivă a nou-născutului și conține factori care stimulează creșterea speciei *Bifidobacterium bifidum* în intestin. Alimentația artificială stimulează implantarea și persistența speciei *Clostridium perfringens.* Rezultatele sugerează existența unui antagonism între *B. bifidum* și *C. perfringens*, care poate fi intensificat de tipul de alimentație Bezirtzoglou, 1997. Când se trece la alimentația artificială, bifidobacteriile sunt înlocuite cu *L. acidophilus.*

În colon, în afara microorganismelor menționate mai sus, sunt prezente specii ale genurilor: *Bacteroides, Eubacterium, Bifidobacterium, Clostridium, Bacillus și Enterococcus.* Atât patogenii, cât și bacteriile lactice pot coexista, la indivizii sănătoși predominînd bacteriile benefice, *L. acidophilus* fiind omniprezent în colon. Deși un mare număr de bacterii este eliminat prin fecale, cele rămase se multiplică rapid și aderă la mucoasa intestinală. Mai mult, *L. acidophilus* persistă și după oprirea ingerării acestuia, spre deosebire de *L. plantarum* și *L. casei,* care sunt prezenți doar tranzitoriu în colon. Alte specii, ca *L. bulgaricus* din iaurt și specii de bifidobacterii, tranzitează colonul, aderă temporar de mucoasa intestinală, fiind necesară ingestia ritmică de alimente îmbogățite cu aceste microorganisme.

9.1.2. Caracteristicele probioticelor

Caracteristica primară a microbiotei indigene și rolul său esențial constă în amplificarea *funcției de barieră antiinfecțioasă* a mucoasei intestinale. Mucoasa TGI vine permanent în contact cu alimentele, antigene proteice și microorganisme din mediul extern.

Bacteriile indigene previn aderența, invazia și colonizarea mucoasei TGI cu alte microorganisme, prin competiție pentru situsurile de aderență. Bacteriile indigene formează un strat dens, fixat intim pe pereții colonului înlăturînd de pe suprafața celulelor epiteliale potențialele alergene proteice din hrana nedigerată sau agenții patogeni. Bacteriile benefice intră de asemenea în competiție pentru nutrienți și dacă predomină numeric, ele utilizează nutrienții, metabolizează glucidele cu producere de acid lactic și acizi grași cu lanț scurt, cum ar fi acidul propionic, butiric și acetic. În consecință, suprafața epitelială va fi menținută la un pH acid impropriu bacteriilor patogene. În colon, primele glucide metabolizate de bacteriile benefice sunt glucidele nedigerabile din hrană, așa numitele fibre alimentare solubile, ca fructooligozaharidele.

Alți factori inhibitori produși de BL sunt H_2O_2 și compușii cu activitate anti-microbiană, microcinele sau bacteriocinele.

În afara funcției de barieră, pe care o exercită microorganismele indigene, acestea sintetizează în colon vitamine (vitamina B_{12}, acid folic, niacină și riboflavină, precum și vitamina K), parțial folosite și de către gazdă.

AGLS reprezintă şi sursă energetică pentru celulele epiteliale ale colonului. BL sintetizează β-galactozidaza, enzimă care converteşte lactoza în glucoză şi galactoză, astfel că produsele lactate fermentate (ex. iaurtul) sunt bine tolerate şi de către indivizii cu intoleranță la lactoză.

Dacă în dietă intră produse conținînd bacterii lactice, acestea stimulează producția de sIgA, prevenind astfel infecțiile la nivelul mucoasei TGI.

Bacteriile lactice (lactococi, lactobacili, streptococi şi enterococi) reprezintă un grup important de microorganisme, folosite în producția alimentelor fermentate de tip iaurt, brînză, salam uscat, aluat acru etc. BL posedă o serie de proprietăți metabolice ce determină acidificarea mediului, proteoliză, sinteză de arome etc. Lactobacili ca *L. acidophillus, L. gasseri, L. paracasei, L. reuteri, L. ramnosus* şi bifidobacterii ca *B. bifidum, B. brevis, B. infantis* şi *B. longum,* sunt folosite în mod curent ca probiotice în țările dezvoltate. BL sunt rezistente la aciditatea stomacală, la activitatea enzimelor digestive şi a bilei din intestinul subțire, putând coloniza (temporar) porțiunea terminală a ileonului şi colonul. În cadrul speciei, fiecare tulpină prezintă proprietăți specifice sub raportul viteză de creştere / metabolism, activitate *proteolitică*, ca şi al producerii de arome şi compuşi cu activitate antimicrobiană.

Lactobacilii metabolizează glucoza la acid lactic în cazul bacteriilor *homofermentative* (genurile *Lactobacillus* şi *Enterococcus*) şi cantități echimoleculare de acid lactic, dioxid de carbon şi etanol (sau acid acetic) în cazul bacteriilor *heterofermentative.*

Cel mai important reprezentant al lactobacililor de tip probiotic, *Lactobacillus acidophilus,* are temperatura optimă de creştere între $35^0 - 40\ ^0$C şi un maxim la 45 ^{0}C, pH–ul optim fiind de 5,5 – 6,0. BL sunt microaerofile, de aceea dezvoltarea pe un mediu solidificat este în general intensificată de anaerobioză sau de o presiune redusă de oxigen, în prezența CO_2 - 5 –10 %.

Bifidobacteriile produc acid acetic şi acid lactic fără generare de dioxid de carbon, cu excepția cazului în care sursa de carbon este reprezentată de gluconat. Acest tip de heterofementație este inițiată de scindarea fructozo 6-fosfatului într-o moleculă cu doi atomi de carbon (C_2) şi una cu patru atomi de carbon (C_4). Conversia moleculei C_2 în acetat este concomitentă cu formarea de heptulozo-7-fosfat din C_4 şi o trioză derivată dintr-o moleculă adițională de fructozo-6-fosfat (vezi cap. „Probiotice" din Tratat de Biotehnologie, Jurcoane ş.a., vol.1, 2004). Heptulozo-7-fosfatul este scindat la rîndul său în două molecule de acetat şi o moleculă de piruvat. A doua moleculă de trioză (derivată din molecula fructozo-6-fosfat adițională), este convertită în lactat. Astfel din două molecule de hexoze rezultă trei molecule de acetat şi două molecule de lactat. Enzima cheie în fermentația glicolitică este fructozo-6-fosfat fosfocetolaza. Toate bifidobacteriile de origine umană pot metaboliza în afară de glucoză şi galactoza, lactoza şi fructoza, precum şi glucide complexe.

Pentru bifidobacterii, pH-ul optim de creştere este de 6,0 – 7,0; nu se dezvoltă la un pH prea acid sau alcalin (sub 5,0 şi peste 8,0) şi la temperaturi sub 28 ^{0}C. Bifidobacteriile sunt strict anaerobe, necesitând prezenţa CO_2 . 5 –10 %, cu excepţia speciei *B. lactis* care este oxigen-tolerantă.

9.1.3 Necesităţi nutriţionale ale bacteriilor lactice de tip probiotic

Necesităţile nutriţionale şi condiţiile de creştere sunt complexe şi se referă la *presiunea scăzută a oxigenului* şi la prezenţa următorilor nutrienţi:

- ► glucide fermentescibile şi vitaminele din complexul B;
- ► acizi nucleici, proteine şi produşii lor de degradare;
- ► acizi graşi nesaturaţi liberi;
- ► elemente minerale: Ca, Mn, Mg şi Fe.

Cantităţi mari de grupări tiol din zerul de lapte bogat în proteine stimulează creşterea tulpinii de *L. acidophilus,* în timp ce peptona şi tripsina stimulează producerea de acid lactic.

Datorită faptului că bifidobacteriile pot să crească şi pe medii sintetice conţinând lactoză, aminoacizi (cisteină, glicină şi triptofan), vitamine, nucleotide şi minerale, ele par a fi mai puţin exigente din punct de vedere nutriţional comparativ cu lactobacilii, care au necesităţi nutriţionale complexe. Spre deosebire de lactobacili, unele bifido-bacterii prezintă capacitatea de a creşte în medii cu azot amoniacal.

Bifidobacteriile cresc mai bine pe medii sintetice bogate, ca MRS şi TPY (mediu specific) decît pe lapte, medii costisitoare pentru producerea de biomasă pe scară industrială. Mai mult, pentru obţinerea produsului finit, cultura este spălată, prin aceasta îndepărtându-se substanţele aromatizante. În pofida acestor dificultăţi, pentru obţinerea unui produs de calitate, cu viabilitate şi textură corespunzătoare, este necesar un mediu pe bază de lapte, datorită conţinutului mai ridicat în proteină (cazeină) decît în medii sintetice. De aceea, se impune suplimentarea laptelui cu extract de drojdie şi factori de creştere sub formă de hidrolizate proteice bogate în vitamine, condiţii de anaerobioză şi un potenţial redox scăzut în fazele iniţiale de creştere. Selecţia de specii oxigen-tolerante poate reprezenta o soluţie pentru a reduce efectul advers al oxigenului. Chiar şi în aceste condiţii, timpul de fermentaţie variază considerabil în funcţie de tulpină şi anaerobioză, bifidobacteriile avînd un timp lung de fermentaţie, datorită dezvoltării slabe pe lapte şi a producerii de acid.

Unele produse lactate fermentate sunt suplimentate cu „factor bifidogenic", care este definit ca un compus de natură glucidică nedegradabil în etajele superioare ale TGI şi care ajuns în colon, este metabolizat preferenţial de bifidobacterii. Factorul bifidogenic intră în conceptul nou al *prebioticelor.*

Prebioticele sunt definite ca ingrediente alimentare nedigerabile, care influențează benefic gazda prin stimularea selectivă a creşterii şi / sau actvității unui număr limitat de bacterii din colon. În această privință, oligoglucidele nedigerabile (NDO), ca fructo-oligoglucidele, xilo-oligoglucidele, galacto-oligoglucidele, malto-oligoglucidele, manan-oligoglucidele, soia-oligoglucidele, lactosucroza, lactuloza etc. Au fost folosite selectiv în dieta bolnavilor, în scopul creşterii relative a numărului bifidobacteriilor din microbiota colonului. Dintre substanțele enumerate mai sus, edulcorantul denumit FOS (*fructo-oligosaccharide*) este un polimer care nu poate fi degradat de enzimele clasice şi nici metabolizat de bacteriile patogene.

O serie de oligoglucide solubile prezente în legume, sunt clasificate ca prebiotice. Unele stimulează creşterea în general a microbiotei, fără diferențiere între bacteriile benefice şi cele patogene. Fructo-oligozaharidele (FOS) sunt utilizate selectiv de bifidobacterii. Produsul final al metabolizării FOS este acidul acetic şi acidul lactic, care inhibă creşterea clostridiilor şi a tulpinilor de *E. coli.* Sursele alimentare de FOS sunt grâul integral, banana, ceapa, usturoiul şi prazul. Întrucît FOS tranzitează TGI fără să fie digerate (la om lipsesc enzimele specifice de degradare ale acestora), ajungând în colon sunt utilizate preferențial de bifidobacterii. S-a determinat că o doză de 4 g FOS/ zi stimulează dezvoltarea bacteriilor benefice, în timp ce ingestia a 15 g FOS/ zi timp de două săptămîni determină creşterea semnificativă a numărului de bifidobacterii şi reduce numărul de clostridii şi alte specii patogene. Doza de FOS preconizată în dietă (în SUA) este de 1- 4g /zi, suplimentele alimentare fiind preparate din rădăcină de cicoare (*Cichorium intybus*). Există de asemenea şi preparate probiotice în compoziția cărora se adaugă şi FOS (cu efect prebiotic).

În colonul copiilor alăptați la sân, creşterea bifidobacteriilor este stimulată selectiv de N-acetilglucozamină şi lactuloză (factori bifidogeni), care se găsesc în laptele de mamă şi în produsele lactate preambalate termic. Numărul de bifidobacterii scade odată cu înaintarea în vârstă a individului, crescînd totodată numărul bacteriilor din genurile *Bacteroides* şi *Eubacterium.*

9.2. TEHNOLOGIA PROBIOTICELOR

9.2.1. Generalități

Viabilitatea BL de tip probiotic variază în funcție de tulpină şi de tehnologia de fabricație aplicată. Pentru a menține interesul față de produsul probiotic, trebuie demonstrată viabilitatea tulpinii din produsul de consum pe

întreaga perioadă a termenului de garanție. La aceasta se adaugă, în afara gustului plăcut și a aspectului atractiv (textură) și efectul benefic asupra sănătății omului.

În ultimii 10 -15 ani au ieșit în evidență dificultățile existente privind cultivarea microorganismelor probiotice în lapte. Producția de culturi probiotice este în general similară cu producția altor culturi de bacterii lactice, deși unele tulpini sunt mai sensibile la stresul ambiental (pH scăzut sau oxigen). Tulpinile trebuie să-și păstreze caracteristicile de probiotic de-a lungul anilor, fiind necesar un model experimental care să evite trecerile repetate ale tulpinilor selecționate. Această cerință este valabilă pentru toate procesele de biosinteză, cum ar fi obținerea de aminoacizi, vitamine, antibiotice, acizi organici etc. (Săsărman ș.a. 1980, 1987, 2002).

În cazul obținerii unui produs lactat probiotic, se urmărește:

- ► productivitatea culturilor starter;
- ► stabilitatea în timpul conservării;
- ► viabilitatea;
- ► evaluarea capacității fermentative a microorganismelor.

9.2.2. Conservarea bacteriilor lactice și reluarea lor în procesele biotehnologice

9.2.3. Conservarea microorganismelor producătoare

Punctul central al oricărei biotehnologii, îl reprezintă microorganismul producător, constituit din culturi pure de tulpini selecționate, conservate în așa numita *„bancă de culturi"*. De regulă, tulpinile se conservă în azot lichid, la o temperatură de –176 ^{0}C („crioconservare"), în congelator la o temperatură de –80^{0}C, sau prin liofilizare. *„Banca de culturi"* (banca de microorganisme), reprezintă sursa de material biologic, numit *conserv*, necesar inițierii fermentației. Conservul este alcătuit dintr-un număr variabil de fiole, stabilit în funcție de necesitățile procesului de producție, reprezentând în final *tulpina de lucru*. Conservul se obține printr-un număr minim de treceri consecutive ale tulpinilor productive și se depozitează în banca de microorganisme.

Materialul din depozit se folosește pentru însămînțarea *culturii stoc*. Se efectuează un număr minim de treceri între cultura de bază (conserv) și *cultura stoc*. Menționăm faptul că unele laboratoare din industrie prepară fiole cu material biologic de bază (conserv) într-o cantitate care să asigure producția timp de 50 -100 ani și *cultura stoc* pentru 3-5 ani. Fiolele de *conserv* și de *cultură stoc* sunt codificate și etichetate corespunzător, înregistrate la fiecare etapă de trecere, așa încât cultura de origine să poată fi identificată ușor.

9.2.4. Prepararea culturilor starter (inocul)

Prepararea şi verificarea culturilor starter se va exemplifica pe tulpini de lactobacili, lactococi şi bifidobacterii.

Pentru lactobacili se foloseşte mediul standard MRS, pentru lactococi mediul M17 la care se înlocuieşte lactoza cu 5% glucoză, iar pentru bifidobacterii, mediul MRS suplimentat cu 0,05% cisteină hidroclorică.

Activitatea culturilor starter se verifică în fermentaţii efectuate în vase cu capacitatea de 10-40 l şi se întrerupe când ingredientele de bază se epuizează. După răcire, cultura corespunzătoare din punct de vedere calitativ, se concentrează prin centrifugare sau filtrare, la depozitul de celule se adaugă substanţe crioprotectoare, iar celulele se imersează în azot lichid în cazul crioconservării sau se depozitează în frigider la temperaturi de –80 ^{0}C, –45 ^{0}C, şi –35 ^{0}C. În cazul liofilizării, fiolele se depozitează la temperaturi de –18 ^{0}C, +5 ^{0}C sau +25 ^{0}C (temperatura camerei).

Stabilirea viabilităţii culturilor se efectuează atât înainte cât şi după conservare, pe medii agarizate, specifice pentru fiecare microorganism în parte. Incubarea se efectuează în condiţii de anaerobioză pentru lactobacili şi bifidobacterii, la 37 ^{0}C timp de 3 zile, iar pentru lactococi, în condiţii de aerobioză la 30 ^{0}C timp de 2 zile. Viabilitatea tulpinilor congelate la –35 ^{0}C şi –45 ^{0}C se analizează din două în două luni, iar a celor depozitate la –18 ^{0}C, +5 ^{0}C şi +25 ^{0}C, în fiecare lună, timp de un an. Viabilitatea tulpinilor conservate la –176 ^{0}C şi la –80 ^{0}C se analizează anual, pâna ce se remarcă o scădere semnificativă a acesteia.

9.2.5. Caracteristicile fermentării laptelui cu tulpini de tip probiotic

Cele mai frecvent folosite bacterii lactice ca probiotice sunt următoarele : *L. salivarius, L. paracasei, L. rhamnosus,* GG (tulpină comercială), *L. johnsonii,* La$_1$ (tulpină comercială), *L. crispatus, L. lactis,* BB12 (tulpină comercială) şi *Lactococcus lactis.*

Procesul de fabricaţie presupune două etape:

- ► prepararea şi caracterizarea culturii starter;
- ► fabricarea produselor lactate fermentate;
- ► evaluarea viabilităţii culturilor.

9.2.6. Prepararea şi caracteristicile culturilor starter

După cum s-a arătat mai sus, prepararea culturilor starter presupune utilizarea unui anumit conserv pentru obţinerea *culturii stoc*, utilizarea unor medii specifice fiecărei tulpini şi desfăşurarea unui anumit proces tehnologic. Culturile

starter astfel obținute, sunt apoi conservate prin metodele expuse anterior, pentru a putea fi utilizate după necesități la fabricarea produselor lactate fermentate.

Tulpinile de tip probiotic pot fi folosite ca atare (adică separat), sau în combinație cu *tulpini suport,* care se adaugă pentru diminuarea acidității produsului. Ca tulpină suport poate fi folosit *Streptococcus thermophilus* sau un amestec de două tulpini folosite la prepararea iaurtului, și anume *Streptococcus thermophilus* și *L. delbrueckii subsp. bulgaricus.* Culturile suport se adaugă sub formă congelată.

Tulpinile de probiotic se dezvoltă pe mediu MRS la 37 ^{0}C pentru 16-18 ore și se concentrează prin centrifugare, fiind folosite pentru inocularea *laptelui* în concentrație de 4 x 10^6 – 2,5 x 10^7 U.F.C./ ml. Când se folosesc pentru inocularea *iaurtului,* tulpinile suport se adaugă sub formă liofilizată.

9.2.7. Fermentația

Fermentația se realizează pe lapte sau pe lapte suplimentat cu factori de creștere, întrucît BL de tip probiotic au o creștere lentă pe lapte. Laptele se ajustează la un conținut de 1,5% grăsime și se prelucrează termic prin menținerea la 95 ^{0}C, timp de 5 min (pasteurizare înaltă).

Pentru stimularea creșterii tulpinilor starter unice, se adaugă 2% glucoză, 0,038% extract de drojdie și trei fracții diferite de hidrolizat de cazeină 0,1%. Fermentația durează aproximativ 26 ore, până ce valoarea pH-ului ajunge la 4,5, temperatura de incubare fiind în funcție de microorganism.

Culturile starter de probiotic se adaugă la iaurtul preparat pe scară industrială sub formă liofilizată.

9.2.8. Evaluarea viabilității culturilor

Culturile starter folosite ca material de însămânțare se consideră de calitate corespunzătoare, dacă în cursul fermentației se obțin 10^9 –10^{10} UFC / ml. Toate culturile starter conservate în azot lichid (metoda de conservare cea mai recomandată) sunt de calitate corespunzătoare. Calitatea materialului de însămânțare liofilizat variază în funcție de tulpină. În timp ce tulpinile *L. paracasei, L.. rhamnosus,* bifidobacteriile și *Lactococcus lactis* ajung până la 10^{12} UFC/g , *L. crispatus* induce o creștere încetinită a celulelor în mediul de fermentație. Tulpinile de *L. johnsoni* La$_1$ și *L. salivarius* conservate prin liofilizare au o viabilitate redusă drastic. Este posibil ca recuperarea parțială a viabilității să se realizeze prin optimizarea formulei de mediu și a condițiilor de conservare.

În ceea ce privește stabilitatea în timpul depozitării culturilor crioconservate și liofilizate, se observă următoarele :

- la -18^0 C viabilitatea este foarte scăzută;
- la -35^0 C numărul de celule scade cu 0 – 1 unități logaritmice;
- la -45^0 C toate tulpinile prezintă o viabilitate bună timp de un an.

Tulpinile liofilizate păstrează viabilitatea timp de două săptămîni pînă la şase luni, la o temperatură de $+25^0$ C, ceea ce face posibil transportul acestora. Depozitarea liofilizatelor la o temperatură de -18^0 C măreşte timpul de valabilitate pînă la un an.

Trebuie subliniat faptul că viabilitatea tulpinilor conservate este funcție de caracteristicile tulpinii şi de tehnica de conservare (azot lichid, liofilizare, conserv vegetativ + $CaCO_3$, etc).

9.3. TIPURI DE PRODUSE LACTATE FERMENTATE

9.3.1. Cultură probiotică cu tulpină unică

Tulpinile unice folosite la prepararea produselor lactate fermentate prezintă inconvenienrul scăderii drastice a pH-ului de pînă la 5,4 pentru *L. johnsoni* (după o incubare de 20 h la 42^0C) şi 4,5 pentru *B. lactis*, fapt care influențează negativ calitățile organoleprice ale produselor. Cu toate acestea, în funcție de tulpină, de mărimea inoculului (raport de însămînțare), laptele pasteurizat poate fi fermentat cu inocul format dintr-o singură tulpină, prin adăugarea la lapte a 2% glucoză, care stimulează creşterea tulpinilor *L. rhamnosus*, GG şi *L. paracasei*. De asemenea, extractul de drojdie stimulează creşterea majorității tulpinilor, în timp ce amestecul de glucoză şi extract de drojdie are efect stimulator mai mare comparativ cu cel al fiecărui ingredient în parte.

9.3.2. Combinații de culturi probiotice cu tulpini suport

În cazul însămînțării laptelui cu tulpini de probiotice, *culturile suport* (tulpini specifice iaurtului), controlează acidifierea laptelui, adesea mărind viteza de formare a acidului lactic. Cultura suport creşte viabilitatea tulpinii probiotice, numărul de celule fiind constant timp de 14 zile de la însămînțare, sau prezintă o uşoară scădere (0,5 unități logaritmice).În unele cazuri, în timpul depozitării, se observă o creştere a numărului de celule.Acest fenomen poate fi explicat prin desprinderea celulelor de BL din lanțuri.

Pentru standardizarea timpului de fermentație şi a evoluției acumulării de acid lactic, se folosesc raporturi de inoculare diferite.

Se constată că dezvoltarea tulpinilor probiotice *L. rhamnosus*, GG, *L. paracasei* şi *Bifidobacterium lactis*, este aproape constantă în combinațiile cu tulpinile din iaurt.

9.3.3. Proprietăţi tehnologice şi organoleptice ale produsului lactic fermentat

Culturile probiotice influenţează vâscozitatea produsului când sunt cultivate cu tulpinile din iaurt şi nu o influenţează atunci când sunt cultivate separat (cultură unică). În general, probioticele reduc vâscozitatea produsului, cu excepţia tulpinii *L. paracasei.*

În general, efectul de separare a zerului (*syneresis*), variază între 0,1% şi 9%.

Evaluarea organoleptică nu evidenţiază diferenţe clare între gustul produselor conţinând probiotic şi cele preparate numai cu tulpinile suport (control). Toate produsele au arome şi gust acceptabile.

Ca în orice produs de biosinteză şi în cazul producţiei de probiotice, se impune selecţia culturilor suport, pentru a obţine o bună supravieţuire în produsele proaspăt fermentate, până în momentul expirării termenului de garanţie. Scăderea uşoară a vâscozităţii, acidificarea în timpul depozitării şi separarea zerului determinată de adausul tulpinilor suport, nu poate fi în general observată în cazul producţiei la scară industrială.

9.3.4. Caracteristicele produselor lactate fermentate de tip probiotic

Viteza de acidifiere, formarea aromei şi a texturii, în produsele probiotice, sunt parametrii care permit obţinerea unor alimente de calitate superioară.

Factorul cheie în fermentarea produselor lactate este reprezentat de viteza de metabolizare a sursei de carbon, în acid lactic. Acidificarea rapidă a materiilor prime, împiedică creşterea microorganismelor nedorite, fiind esenţială pentru formarea aromei, texturii şi gustului dorite. Evoluţia acidităţii culturilor probiotice de BL reprezentate de *L. acidophilus* şi *Bifidobacterium bifidum,* este net inferioară celei ale culturilor tradiţionale de iaurt produs cu *L. delbruecki subsp. bulgaricus* şi *Streptococcus thermophilus*, care fermentează laptele conferind produsului o bună aciditate şi textură. Acest aspect trebuie luat în considerare la fabricarea produselor lactate fermentate. Astfel, culturile din iaurtul tradiţional prezintă o viteză de acidifiere suficient de mare şi conferă produsului caracteristici organoleptice corespunzătoare, în timp ce culturile probiotice nu sunt la fel de eficiente din acest punct de vedere. Deşi *L. acidophilus* acidifică corespuntător laptele, nu acelaşi lucru se poate spune despre formarea aromelor şi texturii produsului finit.

Culturile unice folosite în producţia iaurtului conferă produsului arome uşor diferite. Astfel, laptele fermentat cu *S. thermophilus* este mai puţin acid şi prezintă aromă de unt, în timp ce *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus,* acidifică rapid laptele, conferind o aromă specifică dată de prezenţa acetaldehidei. *L. acidophilus / johnsoni, L. casei / paracasei,* specii de bifidobacterii, produc cantităţi limitate de arome. În general, BL care folosesc calea *heterofermentativă*, produc puţin acid lactic precum şi acid acetic, care imprimă un gust înţepător, agresiv, asemănător cu cel al oţetului. Dioxidul de carbon, rezultat în acest tip de fermentaţie, rupe gelul format la suprafaţa iaurtului, dîndu-i un aspect puţin comercial.

La obținerea unui produs final corespunzător, contribuie în afară de viteza de acidifiere, hidroliza cazeinei (activitatea proteolitică a culturii starter) și biosinteza exopolizaharidelor care conferă textură corespunzătoare produsului.

În concluzie, selecția riguroasă a tulpinilor și menținerea parametrilor de-a lungul procesului de fabricație, este obligatorie pentru obținerea de metaboliți finali caracteristici, ce conferă gust, aromă și textură plăcute. Folosirea combinată a bifidobacteriilor cu *L. acidophilus* și/sau alte BL ar putea fi o soluție pentru rezolvarea acestor probleme.

9.3.5 Viabilitatea probioticelor

Viabilitaea BL probiotice (și a culturilor starter de BL) în iaurt, în alte produse lactate fermentate și alimente obținute din lapte, este influențată de o serie de factori și anume:

- ► tulpinile folosite și interacțiunea dintre acestea;
- ► aciditatea;
- ► temperatura de conservare;
- ► prezența inhibitorilor microbieni în alimente (NaCl, H_2O_2 etc.)

În procesul de fermentație, un rol decisiv îl au următorii factori:

- ► compoziția chimică a mediului de fermentație (sursa de C, ingredientele din mediu);
- ► disponibilitatea nutrienților și a promotorilor de creștere;
- ► parametrii de fermentație (cultură starter slab producătoare de acid lactic adaptată la substrat, raport optim de însămânțare a inoculului, temperatura, oxigenul dizolvat, timp de fermentație).

O altă caracteristică importantă a BL se referă la capacitatea de colonizare a tulpinilor, care poate fi influențată negativ de transferurile multiple în lapte, precum și de tratamentele termice, de omogenizarea și ambalarea produsului finit.

Viabilitatea speciilor din genurile *Lactobacillus, Bifidobacterium* scade drastic în timpul răcirii, păstrării și transportului, astfel încât la sfîrșitul perioadei de garanție a produsului, numărul de celule viabile ajunge sub valoarea impusă de normă.

Datorită complexității procesului fermentativ și a condițiilor necesare în vederea obținerii unui produs lactat fermentat cu caracteristici organoleptice bune și un conținut ridicat în probiotice, este necesară *alegerea, selectarea și monitorizarea tulpinilor*. Altfel spus, culturile starter funcționale trebuie să aibă o capacitate de multiplicare rapidă în faza incipientă de dezvoltare, viabilitate îndelungată și să fie adaptate la matricea alimentului. În timpul tranzitării TGI, trebuie să aibă stabilitate, viabilitate mare și capacitate de excludere a patogenilor prin competiție pentru situsurile de aderență pe suprafața epiteliului intestinal.

În ceea ce privește viabilitatea, s-a constatat că o mică parte din bacteriile probiotice au 10^7 celule / ml sau g de produs în momentul consumării produsului. De aceea, s-a convenit ca doza terapeutică minimă / zi să fie de $10^8 - 10^9$ celule viabile / ml sau g de produs, ceea ce poate fi realizabil printr-o ingestie de aproximativ 100g de produs conținînd $10^6 - 10^7$ celule viabile / ml sau g. „Asociația Băuturilor din Lapte Fermentat cu Bacterii Lactice" din Japonia, a

stabilit un minimum de 10^7 celule viabile / ml în produsele lactate proaspăt fermentate. Asociația Națională a Iaurtului din SUA (*National Yoghourt Assocition, NYA*) recomandă 10^8 celule viabile / g în momentul condiționării (ambalării), iar pe containere să se treacă sigla cu viabilitatea culturii active a produselor. Pe container se va trece de asemenea denumirea „*Probiotic*", numai în cazul în care produsul va avea un conținut minim preconizat de celule viabile la sfîrșitul termenului de garanție.

Au fost semnalate unele cazuri de existența pe piață a unor produse obținute cu specii de bifidobacterii și *Lactobacillus acidophilus*, care în timpul depozitării la rece și la un pH scăzut și-au pierdut viabilitatea, fapt care evidențiază, după cum s-a menționat mai sus, necesitatea selecționării riguroase a tulpinilor. De aceea, au fost efectuate investigații privind mărirea timpului de supraviețuire a tulpinilor, prin înlocuirea substratului (de exemplu, brânză în loc de lapte), sau prin protejarea tulpinilor sensibile la pH acid prin *microîncapsulare* cu polimeri.

9.3.6. Stabilitatea probioticelor în prezența prebioticelor

Suplimentarea produselor lactate de tip probiotic cu NDO (FOS) cu efect prebiotic, are un efect benefic asupra sănătății omului. Pentru obținerea unui produs corespunzător, tehnologia de fabricare trebuie să fie subordonată acestui scop. De exemplu, pentru a ilustra influența pH-ului și a temperaturii, arătăm că la un pH mai mic de 4 și la temperaturi ridicate ale procesării produsului sau la păstrarea lui la temperatura ambientală, oligoglucidele prezente în textura alimentului pot fi hidrolizate, pierzîndu-se prin aceasta proprietățile nutriționale și fizicochimice ale alimentului.

Stabilitatea probioticelor este de asemenea strict dependentă de natura și tipul de oligoglucid (fructo-, galacto-, xilo-, oligoglucide etc.), fiind influențată de oligoglucidul rezidual prezent, structura ciclică, configurația *anomerică* și tipul de legături. După cum se știe, hexozele sunt mai stabile decît pentozele și deoxiglucidele, la fel ca piranozele față de furanoze.

9.3.7. Tehnologia obținerii pe scară industrială a probioticelor

9.3.7.1. Materialul de însămînțare (inoculul)

Pentru obținerea unui probiotic funcțional, de calitate superioară, trebuiesc îndeplinite condiții tehnologice riguroase. Avînd în vedere multiplicarea lentă a BL în lapte, acesta va putea fi folosit numai în cazul respectării condițiilor amintite mai sus, precum și asigurarea condițiilor aseptice de lucru și adăugarea de factori de creștere, promotori care vor permite multiplicarea rapidă a tulpinilor. Apoi, produsul va fi conservat, pentru menținerea unei viabilități și activități maxime, precum și a stabilității impuse de standarde.

Practica obişnuită în fabricile de lapte constă în folosirea unui amestec de culturi preparat anterior, „*gata pentru adaos*", de *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus, S. thermophilus, L. acidophilus,* şi / sau *Bifidobacterium* sp. Inocularea directă a laptelui preambalat oferă o mare flexibilitate a controlului organoleptic şi microbiologic (raportul dintre bifidobacterii şi lactobacili). O tehnică curentă constă în îmbogăţirea laptelui cu extract de drojdie. Se foloseşte apoi o fermentaţie tradiţională discontinuă, urmată de o congelare la temperaturi scăzute sau liofilizarea culturilor. Tulpinile selecţionate pentru însămânţarea directă a cuvelor, trebuie să conţină 10^{10} - 10^{11} UFC/g pentru a asigura o performanţă dorită în producţia comercială de alimente lactate fermentate. Este important de subliniat faptul că tulpinile trebuie să supravieţuiască până la parcurgerea întregului proces tehnologic. În afara acestor cerinţe, culturile starter trebuie să fie stabile (garantate 3 – 12 luni), în timpul prelucrării, depozitării şi distribuirii ulterioare.

L. acidophilus şi speciile de *Bifidobacterium* pot fi cultivate separat, fie înainte de inocularea culturilor tradiţionale de iaurt, fie, în cazul laptelui nefermentat, înainte de încorporare în produs (cazul distribuirii cu amănuntul), pentru a obţine un număr mare de celule viabile la sfârşitul incubării.

Temperatura de incubare de 37^0 - 40^0C va favoriza o mai bună supravieţuire a probioticului, comparativ cu cea de 42^0C, folosită tradiţional pentru prepararea iaurtului.

9.3.7.2. Alcătuirea amestecului de culturi pentru fermentarea produselor lactate

Pentru prepararea de produse lactate fermentate, sunt alcătuite combinaţii de culturi de BL prin care se evită acidificarea slabă a substratului, formarea unor intermediari nedoriţi, precum şi a gustului şi a aromelor nedorite.

La iaurtul tradiţional, se adaugă una sau două culturi în scopul reducerii timpului de fermentaţie şi îmbunătăţirii gustului, aromei şi texturii produsului final. Nivelul scăzut de bifidobacterii în iaurtul comercial, este corelat cu un număr mare de *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus,* care acidifică produsul rapid, fiind responsabil de o acidificare suplimentară a iaurtului la temperatura de conservare în frigider. Pe de altă parte, *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus* are un efect stimulator asupra tulpinilor de *B. bifidum,* probabil datorită activităţii proteolitice a acestuia. Una dintre cele mai bune combinaţii este cea formată din *B. longum* şi *S. thermophilus* deşi cultivarea acestor specii pare a fi în detrimentul bifidobacteriilor, datorită acidificării rapide produse de *S. thermophilus* în timpul fazei timpurii de creştere. Deşi *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus* produce mai mult acid, astfel că pH-ul final va fi mai scăzut decât în cazul fermentării laptelui cu *S. thermophilus* şi poate produce H_2O_2 inhibitor pentru aceste microorganisme, acidul acetic produs de bifidobacterii poate avea un efect inhibitor secundar faţă de speciile de lactococi şi streptococi. Prin încorporarea tulpinii *S. thermophilus,* (consumatoare de oxigen şi rezistentă la aciditate), nivelul oxigenului poate fi redus şi, în consecinţă, va fi îmbunătăţită creşterea viabilităţii bifidobacteriilor, realizîndu-se aşa numita creştere sinergică a celor două tulpini. De aceea, în practica industrială, este larg răspîndită tehnologia de fabricare a iaurtului ABT (fermentat cu *L. acidophilus,* specii de bifidobacterii şi *S. thermophilus*). Uneori se foloseşte o singură tulpină, de exemplu

L. casei Shirota, caz în care fermentația durează o săptămînă. Indiferent de tehnologia aplicată, problema cheie rămâne viabilitatea tulpinilor probiotice de BL prezente în produs, (de exemplu, amestec de *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus, S. thermophilus, L. acidophilus* sau *L. casei* şi *B. longum*), capabile să supravieţuiască până la data consumării acestuia. Se consideră că la o viabilitate de 10^6 / g celule de bifidobacterii la sfîrşitul fermentaţiei, numărul de celule viabile de BL probiotice (altele decît bifidobacteriile), trebuie să rămînă stabil pînă la termenul de garanţie anticipat.

9.3.7.3. Caracteristicile funcţionale ale *culturilor starter*

După cum s-a amintit mai sus, *tulpinile probiotice* trebuie să prezinte o bună supravieţuire în produsul lactat fermentat şi în TGI. *Culturile starter* trebuie să prezinte bune proprietăţi funcţionale şi anume, productivitate iniţială ridicată în aliment (textură) şi în timpul procesului de fabricaţie.

În afara acidificării, o caracteristică metabolică de dorit ar fi producerea de compuşi antimicrobieni cum ar fi substanţele *bacteriocin-like* (potenţial importanţi în conservarea alimentelor şi în competiţia prin excludere în colon), precum şi producerea de exopolizaharide (polimeri glucidici care contribuie la textura alimentelor) etc.

Studiile efectuate au demonstrat că adesea aceste proprietăţi metabolice pot fi evidenţiate în laborator (studii *in vitro*) şi mai puţin în alimente, cu excepţia probioticelor, al căror efect în colon a fost evidenţiat cu prisosinţă. Un exemplu concludent constă în faptul că multe tulpini de BL produc peptide antimicrobiene sau *bacteriocine*, care inhibă *in vitro* tulpinile dăunătoare sau patogene din produs, dar nu şi *in situ*. Astfel, în brânză sau în carne, fenomenul poate fi datorat limitării difuziei sau inactivării prin unii compuşi ai alimentului, care influenţează cultura starter.

Prin aceasta se reliefează odată în plus importanţa deosebită a tulpinilor în procesul de fabricaţie. Este cazul folosirii culturilor starter producătoare de exopolizaharide pentru obţinerea unui iaurt mai vâscos, cu conţinut scăzut de grăsimi, cremos, fără probleme de separare a zerului (*syneresis*). În prezent, pentru evitarea fenomenului de separare a zerului, fabricarea iaurtului se bazează pe procedee de procesare prefermentativă a laptelui, ca adăugarea de lapte praf, pudră de zer, cazeinat etc. sau de concentrare a laptelui (prin evaporare, filtrare etc.), de tratare termică, omogenizare, incubare în anumite condiţii şi adăugarea de coagulanţi şi / sau stabilizatori (interzişi în multe ţări), cum ar fi poliglucidele de natură vegetală modificate chimic şi gelatina.

O alternativă promiţătoare ar consta în folosirea de BL producătoare de exopolizaharide. Deşi *S. thermophilus* produce în condiţii de laborator peste 1,5 g polimer/l pe un mediu optim, *in situ* (în iaurt) se obţin numai 0,03 – 0,8 g polimer/l. Şi în acest caz, tulpina folosită, natura polimerului glucidic sintetizat, factorii asociaţi cu condiţiile de obţinere a laptelui, influenţează procesul tehnologic aplicat.

În concluzie, cunoaşterea metabolismului tulpinilor de bacterii lactice folosite la fermentarea laptelui, permite selecţia şi utilizarea tulpinilor cu proprietăţi funcţionale optime, în vederea obţinerii de culturi starter.

Producerea de bacteriocine și exopolizaharide, ca și efectul probiotic (îmbunătățirea stării de sănătate a gazdei), trebuie adaptate la substratul de fermentație și textura – matricea alimentului (lapte, carne, cereale).

Produsul finit trebuie să aibă un termen de garanție, proprietățile organoleptice (gust, culoare, aromă) și textura dorite. În final, BL probiotice trebuie să fie prezente și viabile în număr suficient de mare și să-și mențină activitatea metabolică chiar după termenul de expirare al produsului.

9.4. EVALUAREA PROBIOTICELOR ÎN HRANĂ

Experții FAO (*Food and Agriculture Organisation*) și OMS (*WHO – World Health Organisation*) s-au reunit în London, Ontario, Canada (2002), în scopul alcătuirii unor norme și metodologii de evaluare a proprietăților nutriționale și de sănătate a probioticelor. Experții au acceptat denumirea de *probiotic* în hrană, au exclus termenii de a*gent bioterapeutic* și *microorganisme benefice*, stabilind și norme pentru evaluarea probioticelor din alimente, reprezentate sugestiv în schema din figura 9.1.

9.4.1. Gen, specie, tulpină

În vederea unei utilizări corecte este necesară cunoașterea genului și speciei tulpinilor probiotice. Se știe că efectul probiotic este determinat de tulpina folosită (efect tulpin - specific). Identitatea tulpinii este importantă pentru a corela tulpina cu efectul benefic asupra individului, atât pentru o supraveghere atentă, cât și pentru studii epidemiologice. Excepție fac *S. thermophilus* și *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus,* care intensifică digestia lactozei la indivizii cu intoleranță la lactoză. În acest caz sau în altele asemănătoare, când există un suport științific care susține efectul benefic al speciilor respective, care nu este tulpin – specific, identificarea tulpinii nu reprezintă un moment cheie.

Încadrarea taxonomică se face aplicând metodele curente. Se recomandă folosirea testelor fenotipice și genetice.

Nomenclatura microorganismelor (atribuirea de nume taxonilor definiți; clasificarea) se va face în conformitate cu denumirile științifice recunoscute, cuprinse în:

► *Approved list of Bacterial Names* (Int. J. Syst. Bacteriol., 1980, 30: 225-420 (este încă valabilă)

► *Validation list*, publicată în Int. J. Syst. Bacteriol., prior to 2000.

Metode genotipice recomandate:

► Hibridizarea ADN: ADN (pentru determinarea speciei), care poate fi înlocuită cu

► Studii pe ARN_r 16 S; rezultatele acestor teste vor fi coroborate cu cele ale testelor fenotipice pentru confirmare.

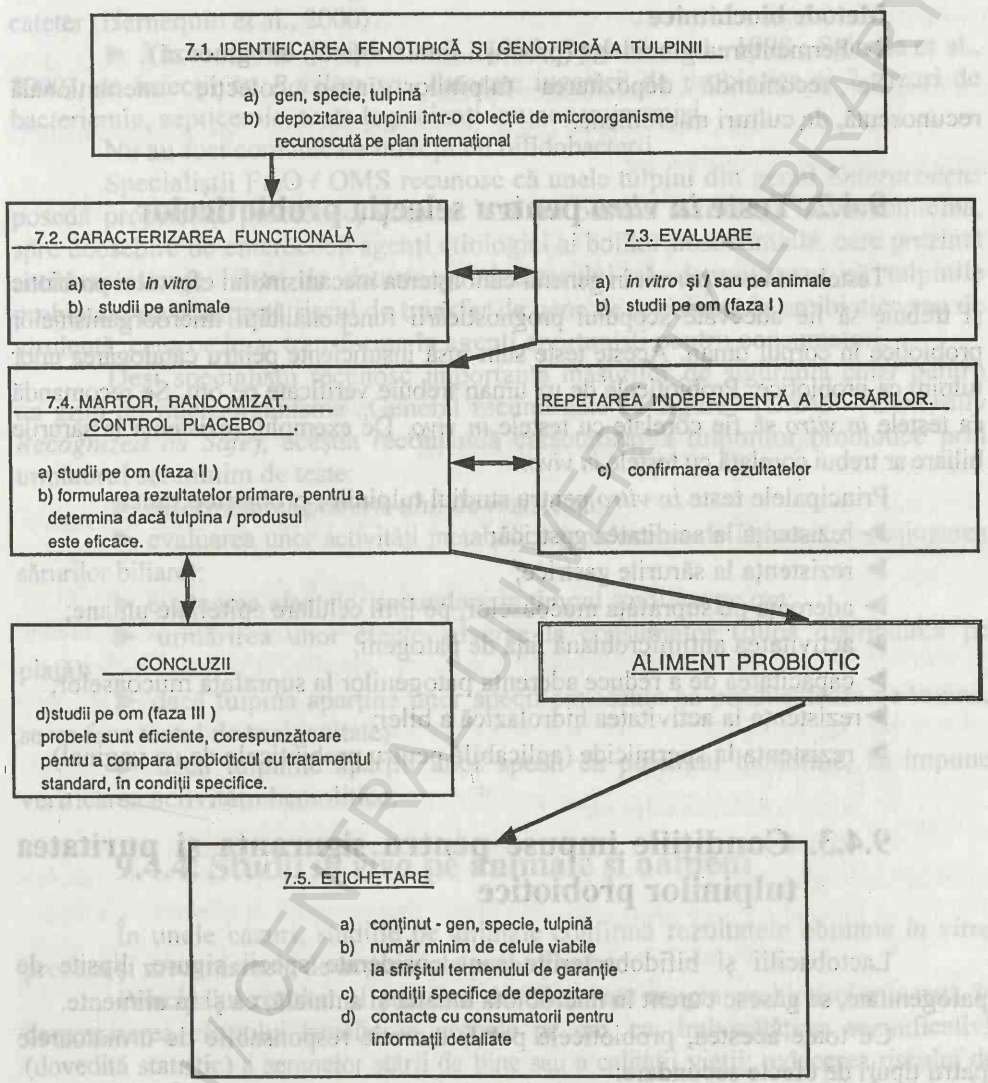


Figura 9.1. Schema evaluării probioticelor din alimente.

► PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (Gel electroforeză în cîmp pulsatoriu)

► RAPD – *Randomly Amplyfied Polymorphic DNA* (Amplificarea randomizată a ADN polimorfic)

► Determinarea elementelor genetice extracromozomiale

BC UMF IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Metode biochimice

► Fermentarea glucidelor (produşii finali obținuți din glucoză)

Se recomandă depozitarea tulpinilor într-o colecție internațională recunoscută, de culturi microbiene.

9.4.2. Teste *in vitro* pentru selecția probioticelor

Testele *in vitro* permit în general cunoaşterea mecanismului efectului probiotic şi trebuie să fie adecvate scopului prognosticării funcționalității microorganismelor probiotice în corpul uman. Aceste teste sunt însă insuficiente pentru catalogarea unor tulpini ca probiotice. Probioticele de uz uman trebuie verificate pe om. Se recomandă ca testele *in vitro* să fie corelate cu testele *in vivo*. De exemplu, rezistența la sărurile biliare ar trebui corelată cu testele *in vivo*.

Principalele teste *in vitro* pentru studiul tulpinilor probiotice sunt :

► rezistența la aciditatea gastrică;
► rezistența la sărurile gastrice;
► aderența pe suprafața mucoaselor, pe linii celulare epiteliale umane;
► activitatea antimicrobiană față de patogeni;
► capacitatea de a reduce aderența patogenilor la suprafața mucoaselor;
► rezistența la activitatea hidrolazică a bilei;
► rezistența la spermicide (aplicabilă pentru probioticele de uz vaginal).

9.4.3. Condițiile impuse pentru siguranța şi puritatea tulpinilor probiotice

Lactobacilii şi bifidobacteriile sunt cosiderate specii sigure, lipsite de patogenitate, se găsesc curent în microbiota umană şi animală, ca şi în alimente.

Cu toate acestea, probioticele pot fi teoretic responsabile de următoarele patru tipuri de efecte secundare:

► infecții sistemice;
► devierea activității metabolice;
► stimularea excesivă a imunității la indivizi sensibili;
► transfer de gene.

O corelare documentată între infecțiile sistemice şi consumul de probiotice nu poate fi dovedită, deşi au fost comunicate următoarele infecții asociate cu consumul de produse comerciale:

► 2 cazuri cu *L. rhamnosus* (Rantio et al., 1999; Mackay et al., 1999).

► 13 cazuri de fungemie cu *Saccharomyces* datorate contaminării unui cateter (Hernequin et al., 2000)

► 3 comunicări (Richard et al., 1988; Oggioni et al., 1998 ; Spinosa et al., 2000), de infecții cu *Bacillus sp.*, datorate ingerării de probiotice și 7 cazuri de bacteriemie, septicemie, toate la pacienți imunocompromiși.

Nu au fost comunicate infecții cu bifidobacterii.

Specialiștii FAO / OMS recunosc că unele tulpini din genul *Enterococcus* posedă proprietăți probiotice, acestea însă nu posedă rezistență la vancomicină, spre deosebire de enterococii agenți etiologici ai bolilor nosocomiale, care prezintă antibiorezistență. Este de datoria producătorului să demonstreze că tulpinile probiotice nu comportă riscul de transfer de gene de rezistență la antibiotice sau de virulență, ceea ce le-ar transforma în agenți oportuniști pentru consumatori.

Deși specialiștii recunosc importanța măsurilor de siguranță chiar pentru un grup de microorganisme „General recunoscute ca sigure" (*GRAS – Generally Recognized as Safe*), aceștia recomandă caracterizarea tulpinilor probiotice prin următorul set minim de teste:

► determinarea *pattern*-ului de rezistență;

► evaluarea unor activități metabolice (producerea de D-lactat, deconjugarea sărurilor biliare);

► evaluarea efectelor secundare în timpul studiilor pe om;

► urmărirea unor efecte adverse la consumator (după distribuirea pe piață);

► dacă tulpina aparține unor specii cunoscute ca producătoare de toxine, se va face testul de toxigenitate;

► dacă tulpinile aparțin unor specii cu potențial hemolitic, se impune verificarea activității hemolitice.

9.4.4. Studii *in vivo* pe animale și oameni

În unele cazuri, studiile pe animale confirmă rezultatele obținute *in vitro* precum și mecanismele de acțiune ale probioticelor.

Principalul rezultat al studiilor de eficacitate asupra probioticelor constă în demonstrarea efectului benefic în probele pe om, ca: îmbunătățirea semnificativă (dovedită statistic) a semnelor stării de bine sau a calității vieții; reducerea riscului de îmbolnăvire, creșterea intervalului dintre îmbolnăviri; recuperarea rapidă după boală. Toate acestea se corelează cu calitățile probioticului testat.

Probioticele sunt testate sub raportul impactului asupra diferitelor condiții clinice. Metodele standard de evaluare clinică, sunt cuprinse în:

► faza 1 siguranță;

► faza 2 eficacitate;

► faza 3 eficiență;

► faza 4 supraveghere.

Faza 1 are ca țintă siguranța (vezi 9.4.3). Faza 2 în general, sub formă randomizată, dublu orb, model *placebo,* măsoară eficacitatea comparativ cu tipul *placeb;* măsoară de asemenea efectele adverse. Recomandare: substanța *placebo* va

fi inclusă în hrana lipsită de probiotic. În continuare, se face un calcul statistic al rezultatelor biologice relevante.

În general, probioticele livrate în hrană nu sunt testate în faza 3 de studiu, care are ca scop compararea rezultatelor cu terapia standard.

Se recomandă ca probele pe om să fie repetate în centre diferite de analize, pentru confirmarea rezultatelor.

Rezultatele acumulate, care demonstrează că tulpina este un probiotic, inclusiv probele clinice, se publică în reviste cu referenți sau în reviste medicale. Este încurajată publicarea rezultatelor negative, întrucât ele contribuie la susținerea eficienței probioticului.

9.4.5. Recomandări privind starea de sănătate și etichetarea probioticului

În majoritatea țărilor, sunt impuse numai cîteva cerințe generale referitoare la conținutul probioticului.

Grupul de lucru recomandă ca cerințele privind folosirea probioticului să se alcătuiască numai când sunt acumulate suficiente date științifice și să fie trecute pe etichetă și în materialul promoțional. Datele se introduc în *„Codul general de norme"*, (*Codex General Guidelines Claims*).

Pe etichetă se trec:

- ► genul, specia, tulpina;
- ► funcționalitatea tulpinii;
- ► numărul minim de celule viabile, pentru fiecare tulpină, la sfârșitul termenului de garanție;
- ► doza eficace de probiotic;
- ► cerințe privind starea de sănătate;
- ► condiții adecvate de depozitare;
- ► indicații privind contactarea firmei, în scopul informării consumatorului.

RECOMANDĂRI:

Grupul de lucru FAO / OMS face următoarele recomandări privind probioticele :

- ► Adoptarea (acceptarea) definiției probioticelor ca *„microorganisme vii care administrate în cantități adecvate sunt benefice pentru gazdă."*
- ► Adoptarea și folosirea normelor propuse reprezintă o *condiție prealabilă* pentru a defini tulpina ca *probiotic.*
- ► În cazul existenței unor probe științifice evidente privind efectul benefic al microorganismelor, pe eticheta produsului vor fi trecute caracteristicile prevăzute de normă pentru probiotic.

► *Normele de bună practică de producţie* (GMP – *Good manufacturing practices*) vor fi aplicate în industria alimentară de produse probiotice, asigurîndu-se calitatea şi termenul de garanţie indicate pe etichetă.

► Continuarea şi îmbunătăţirea metodelor *in vitro* şi *in vivo* de evaluare a funcţionalităţii şi siguranţei probioticelor.

9.5. POSIBILITĂŢI DE CREŞTERE A EFICIENŢEI PREPARATELOR PROBIOTICE

Datorită numeroaselor studii care au demonstrat eficienţa preparatelor de tip probiotic în îmbunătăţirea stării de sănătate a animalelor şi implicit creşterea productivităţii acestora, în ultimii ani se caută soluţii de potenţare a efectului probiotic prin diverse metode cum ar fi: selecţia unor tulpini mai eficiente, manipularea genetică, mixarea mai multor tulpini de microorganisme şi/ sau obţinerea de produse combinate pe bază de probiotice şi compuşi care au acţiune sinergică cu acestea.

În ciuda numeroaselor cunoştinţe acumulate până în prezent, rămân însă o serie de aspecte neelucidate privind efectul probiotic, iar eficienţa preparatelor probiotice este contradictorie. Un astfel de exemplu îl constituie studiile realizate în 1997 de Bomba şi în 1998 de Depta, care prin rezultatele obţinute au evidenţiat rolul protector al lactobacililor şi bifidobacteriilor împotriva diareei la porci, rezultate neconfirmate de alte două studii realizate de către Decupere în 1992 şi Bekaert în 1996. O posibilă explicaţie a rezultatelor contradictorii obţinute o constituie diferenţele de preparare a probioticelor şi condiţiile de administrare. În ciuda faptului că o serie de efecte şi mecanisme rămân neelucidate, totuşi se încearcă creşterea eficienţei preparatelor probiotice pornind de la informaţiile deja acumulate în acest domeniu. Efectul antibacterian al fiecărui microorganism probiotic, ca şi efectele benefice exercitate asupra gazdei pot fi mediate de unul sau mai multe mecanisme exprimate la diferite nivele. Acesta reprezintă un punct de pornire în vederea potenţarii eficienţei probioticelor prin amplificarea mecanismelor de acţiune sau prin extinderea ariei de acţiune a acestora.

Dintre metodele de potenţare a efectului probiotic cea mai eficientă din punct de vedere practic o reprezintă adăugarea de compuşi naturali cu acţiune sinergică (Tabel 9.1).

Tabelul 9.1.

Compuși cu posibilă acțiune de potențare a efectului probiotic al microorganismelor

Compuși	Bibliografie
Fructo-oligozaharide	Nemocova et al., 1999
Extract de rădăcină de *Coleus froskohlii* Briq. (urzică).	Yadava et al., 1995
Ulei de *Origanum* (sovârf)	Kyriakis et al., 1998
Extract de morcovi	Babic et al., 1994
Fitine	Nakashima, 1997
Zer	Edens et al., 1991
Maltodextrina KMS X-70	Bomba et al., 1999
Cultură suport în lapte fermentat	Saxelin et al., 1999
Lapte fermentat	Hosoda et al., 1996
Acizi grași polisaturați	Ringo and Gatesoupe, 1998
Vaccin cu *Salmonella*	Methner et al., 1999
Anticorpi specifici anti-*Salmonella typhimurium*	Promsopone et al., 1998
Zinc	Holm and Poulsen ,1996

9.5.1. Probiotice și prebiotice

Una dintre provocările potențării acțiunii probioticelor o reprezintă realizarea unui compus care să conțină una sau mai multe tulpini probiotice și substraturi prebiotice, care să amplifice eficiența produsului aplicat clinic. Un prebiotic reprezintă un compus nedigestibil care influențează starea de sănătate a gazdei prin stimularea selectivă a creșterii si/sau activității unui număr limitat de microorganisme din colon. Pentru ca un compus să fie prebiotic trebuie să îndeplinească câteva condiții :

1. să nu fie hidrolizat și nici absorbit în partea superioară a tractului gastro-intestinal;
2. să reprezinte un substrat selectiv pentru bacteriile comensale cu rol benefic din colon în vederea amplificării creșterii și/sau activității metabolice;
3. să fie capabil să inhibe anumite microorganisme de la nivelul colonului favorizând dezvoltarea microbiotei comensale normale;
4. să inducă efecte sistemice și luminale care sunt benefice pentru starea de sănătate a gazdei.

O modalitate de potențare a eficienței preparatelor probiotice o reprezintă combinarea acestora cu prebiotice și obținerea unui ***produs simbiotic***. În 1995, Gibson & Roberfroid au definit termenul de ***simbiotic*** ca fiind «***un amestec de probiotice și prebiotice care au efecte benefice asupra gazdei, prin îmbunătățirea supraviețuirii și introducerea de celule microbiene vii din suplimente alimentare în tractul gastrointestinal și prin activarea metabolismului și/sau amplificarea***

dezvoltării unuia sau mai multor microorganisme de la nivelul microbiotei intestinale ».

Multe din oligozaharide îndeplinesc condițiile menționate mai sus pentru a fi utilizate ca prebiotice. Efectul sinergic al tulpinii de *L. paracasei* și fructo-oligozaharidelor a fost demonstrat de către Nemcova, Gancarcikova, Herich și Guba (1999) într-un studiu realizat pe porci în urma căruia s-a constatat că administrarea produsului simbiotic determină creșterea numărului total de anaerobi, aerobi, lactobacili, bifidobacterii și scăderea numărului de clostridii, enterobacterii, inclusiv tulpini enteropatogene de *E. coli.*

9.5.2. Probiotice potențate

Simbioticele sunt preparate care au un rol protector și stimulativ numai la nivelul colonului. Luând însă în considerare faptul că în cazul animalelor tinere riscul îmbolnăvirii datorat microorganismelor patogene este ridicat, se impune găsirea unor soluții în vederea protejării mucoasei tractului digestiv pe toată lungimea acestuia, inclusiv la nivelul intestinului subțire.

Probioticele potențate sunt definite ca «***biopreparate conținând tulpini microbiene și compuși naturali care acționează sinergic, amplificând efectul probiotic atât la nivelul intestinului subțire și cât și al colonului prin intensificarea mecanismelor și prin extinderea ariei de acțiune a activității probiotice***». Criteriile de selecție a probioticelor potențate sunt urmatoarele:

1. eficiența probioticului potențat să fie mai bună decât a componentelor luate separat;
2. efectele stimulatoare și protectoare să fie exercitate în toate compartimentele tractului digestiv.

Pe baza criteriilor menționate mai sus un compus simbiotic poate fi considerat un probiotic potențat numai în cazul în care efectul probiotic al acestuia se exercită și la nivelul intestinului subțire.

9.5.3. Probiotice și fitocompuși

Bacteriile lactice previn diareea coliformă indirect prin influențarea populației de *E. coli* sau direct prin neutralizarea enterotoxinei, având efecte similare extractelor de plante. Un extract alcoolic de rădăcină de *Coleus froskohlli Briq.* prezintă o acțiune inhibitorie asupra toxinei secretată de *E. coli* la nivelul ileonului de iepure și porcușori de Guineea. Este interesant de luat în considerare potențarea eficienței probioticelor în controlul sindromului diareic după înțărcare la porci. S-a demonstrat prin experimente *in vitro* (Sivropoulou et al., 1996) *și în vivo* (Kyriakis et al., 1998) că uleiul esențial obținut din *Origanum* are efect antimicrobian exercitat față de anumite microorganisme, inclusiv față de tulpinile de *E. coli* enterotoxigene și astfel acționează eficient în controlul sindromului diareic și în creșterea performanțelor animaliere.

Un alt compus cu acțiune antimicrobiană îl reprezintă extractul alcoolic de morcovi, în cazul căruia acidul dodecanoic și esterii metilici sunt compușii activi responsabili de inhibiția unui număr mare de microorganisme patogene existente în hrană. De asemenea, s-a constatat eficiența unui extract de *Okoubaka* (arbore african) în tratarea diareei induse de enterotoxine la cai.

În același timp, o parte din fitocompuși stimulează creșterea si metabolismul bacteriilor lactice și implicit producerea de acid lactic. Nakashima în 1997 afirma că efectul stimulator asupra tulpinii de *L. casei* se datorează în mod special ionilor de Mn și nu fitinei.

9.5.4. Probiotice și substraturi nespecifice

Prebioticele sunt substraturi specifice, fermentate selectiv la nivelul colonului, dar în afară de acestea există și substraturi nespecifice care au rolul de a potența efectul probiotic. De exemplu activitatea antimicrobiană a microbiotei cecale față de *Salmonella sp.* a fost amplificată prin suplimentarea dietei puilor cu lactoză. Reducerea colonizării cecale a fost urmată de creșterea concentrației acizilor volatili și implicit de scăderea valorilor de pH. Administrarea unui compus pe bază de tulpini de *Lactobacillus* și peptide animalelor a condus la reducerea mortalității acestora determinată de diaree și la scăderea disfuncționalităților digestive. S-a observat că cele două componente acționează sinergic amplificând efectul probiotic determinat de bacteriile lactice. Un experiment realizat de către Edens, Parkhurst & Casas (1991) pe pui, cărora le-a fost suplimentată dieta cu zer și *L. reuteri* a fost urmat de creșterea rezistenței puilor la infecția cu *Salmonella* și implicit de creșterea în greutate a acestora. Introducerea zerului în nutriția puilor a condus la amplificarea semnificativă a numărului de lactobacili și streptococi și implicit a concentrației de acid lactic. Compuși ca α- lactalbumina și β-lactoglobulina s-au dovedit a fi excelenți promotori de creștere pentru bifidobacterii.

Recent a fost recunoscut faptul că anumite proteine prezente în zer conferă protecție antibacteriană și imunologică nou-născuților, în timp ce alte proteine, atunci când sunt ingerate au alte efecte biologice dintre care menționăm acțiunea anticancerigenă (McIntosh et al., 1998).

Bomba, Nemcova, Gancarcikova, Herich și Kastel în 1999 au investigat influența administrării preventive de *L. casei* și maltodextrina KMS X-70 la purcei, administrare care determină scăderea aderenței tulpinilor de *E. coli* la mucoasa tractului intestinal și implicit scăderea numărului de celule de *E. coli* care colonizează jejunul.

9.5.5. Probiotice și metaboliți ai microorganismelor

S-a constatat ca bacteriile lactice produc o serie de substanțe cu acțiune antimicrobiană cum ar fi metaboliți toxici ai oxigenului, acizi organici și

bacteriocine, motiv pentru care pot fi utilizate împreună cu alţi compuşi (perete celular de drojdii) ca alternativă la promotorii de creştere pe bază de antibiotice.

Mixarea unei culturi probiotice cu o cultură suport amplifică rata de acidifiere şi creează o barieră profilactică împotriva disfuncţionalităţilor digestive.

Administrarea de lapte fermentat cu *L. acidophilus* LA-2 determină creşterea numărului de celule de *Lactobacillus* şi *Bifidobacterium* în intestinul uman. Recent testele *in vivo* au confirmat activitatea bactericidă a acizilor graşi şi importanţa acestora în prevenirea, eliminarea şi în anumite cazuri tratarea infecţiilor. Numărul de bacterii lactice asociat cu mucoasa intestinală şi din materiile fecale a fost mult mai mare în cazul peştilor cărora le-a fost administrat 7% acid linolic sau 4% acizi polinesaturaţi. Se poate emite ipoteza că o dietă bogată în acizi organici afectează situsurile de ataşare ale microorganismelor prin posibila modificare a peretelui intestinal.

Câteva metode de control al tulpinilor enterotoxigene de *E. coli*, care determină diarea implică utilizarea bacteriocinelor în alimente şi în agricultură, de aceea combinarea microorganismelor probiotice cu bacteriocine poate amplifica efectul pozitiv exercitat asupra stării de sănătate a gazdei.

9.5.6. Probiotice şi antibiotice

Probioticele sunt deseori considerate un substitut natural al antibioticelor, dar administrarea combinată de probiotice şi antibiotice ar putea oferi un avantaj suplimentar. Microorganismele probiotice pot coloniza mai uşor nişele de la nivelul tractului digestiv atunci când microbiota normală a fost afectată de tratamentul cu antibiotice. În acelaşi timp administrarea de preparate conţinând lactobacili poate proteja animalul gazdă de efectele negative care apar în urma utilizării antibioticelor.

Principalul risc al tratamentului cu antibiotice îl reprezintă transferul genelor de antibiorezistenţa între diferite tulpini bacteriene ceea ce implică posibilitatea translocării acestora şi declanşarea septicemiei. Administrarea de antibiotice împreună cu *L. casei, L. acidophilus* şi *L. bulgaricus* previne atât creşterea numărului de bacterii rezistente la ampicilină cât şi translocarea acestora în ficat. În acelaşi timp lactobacilii pot interveni în menţinerea echilibrului interspecific la nivelul microbiotei intestinale.

9.5.7. Probiotice şi vaccinuri

Studiile realizate în 1999 de către Methner, Barrow, Brendt şi Steinbach au demonstrat faptul că administrarea vaccinului împotriva infecţiilor cu *Salmonella* concomitent cu un preparat de tip probiotic asigură o protecţie mult mai ridicată comparativ cu administrarea separată a celor două. Combinaţia de *L. acidophilus, E. faecium şi* anticorpi specifici anti - *Salmonella typhimurium,* administrată puilor

sub formă de *spray* determină reducerea semnificativă a numărului de patogeni care colonizează cecumul şi colonul.

9.5.8. Probiotice şi microelemente

O serie de microorganisme au capacitatea de a lega ionii metalici prezenți în mediul înconjurator la suprafața peretelui celular sau de a-i internaliza în celule. Această proprietate poate fi exploatată în obținerea de preparate probiotice. Drojdiile şi lactobacilii pot concentra seleniul din mediul de creştere în celule şi-l pot transforma în seleniu organic, de aceea recent a fost creat un supliment pe bază de drojdii şi lactobacili îmbogățiti cu seleniu.

Un alt exemplu este cromul trivalent - constituent activ al factorului de toleranță la glucoză (GTF – *glucose tolerance factor*), care la rândul său este un cofactor de potențare a insulinei. Drojdiile sunt capabile să producă GTF şi să constituie în acelaşi timp ca supliment alimentar de crom - bioactiv şi netoxic.

Fierul este un element nutritiv esențial pentru toate microorganismele, mai puțin genul *Lactobacillus*, de aceea legarea fierului de către bifidobacteriile şi lactobacilii din preparatele probiotice poate determina scăderea fierului liber disponibil pentru microorganismele patogene. Anumite tulpini de lactobacili sunt capabile să concentreze manganul, element care amplifică activitatea superoxid-dismutazei sau pseudocatalazei. Adăugarea de mangan în mediul de creştere determină creşterea viabilității tulpinilor de *L. casei spp. casei* şi *L. plantarum*.

9.5.9. Manipularea genetică

O altă modalitate de potențare a efectului probiotic o reprezintă manipularea genetică, care se poate realiza prin:

- rearanjarea genetică print-o singură etapă - amplificarea anumitor gene, realizarea de deleții controlate, inserția sau eliminarea de plasmide;
- rearanjarea genetică prin transfer de ADN în cadrul aceleiaşi specii;
- modificări trans-specifice, caz în care modificarea genetică se realizează cu ADN de la alte specii.

Un exemplu de bacterii lactice modificate genetic îl reprezintă cele care au fost utilizate în obținerea unor tipuri de brânzeturi şi cărora le-au fost introduse gene de rezistență la toxina tetanică şi la rotavirusul de la bovine. Totuşi, capacitatea de transfer spontan al genelor la nivelul microbiotei tractului intestinal este un factor care limitează utilizarea acestei metode. De aceea microorganismele modificate genetic intră de câțiva ani sub incidența legislației introduse de Uniunea Europeană (*Novel Foods Regulation*) (Feord, 2002; Lindgren, 1999). Până acum, nici un microorganism modificat genetic nu a fost autorizat ca aditiv alimentar datorită riscurilor pe care acest tip de microorganisme le implică.

9.6. PROBIOTICE DE UZ ZOOTEHNIC

9.6.1. Scurt istoric al obținerii preparatelor de uz zootehnic

Dată fiind relația simbiotică dintre animale și microorganismele care formează microbiota digestivă s-a constatat că dezechilibrele balanței microbiene (disbioză) implică o scădere a rezistenței la microorganisme patogene și implicit, o deteriorare a stării de sănătate a gazdei. De aceea, inițial animalelor care aveau astfel de deficiențe, li se administra suspensie fecală de la animalele sănătoase în vederea restabilirii balanței microbiene. Această metodă implică însă și riscul introducerii de microorganisme patogene, de aceea s-au căutat soluții mai eficiente și mai sigure.

În 1974 Parker a încercat identificarea de organisme care să fie administrate ca supliment alimentar în vederea îmbunătățirii stării de sănătate a animalelor. De atunci, cele mai des utilizate microorganisme în obținerea de preparate probiotice de uz animal cât și uman sunt bacteriile lactice (lactobacili, streptococi și bifidobacterii), care au un grad scăzut de risc datorită prezenței lor la nivelul microbiotei digestive la animalele sănătoase și datorită lipsei efectelor adverse.

Alte microorganisme frecvent întâlnite în preparatele de tip probiotic sunt: tulpini aparținând genului *Bacillus*, tulpini de drojdii aparținând speciilor *Saccharomyces cerevisiae* și *Saccharomyces boulardii* și tulpini de fungi filamentoși aparținând speciei *Aspergillus oryzae*.

Selecția bacteriilor lactice ca supliment alimentar datează din era precreștină când oamenii consumau lapte fermentat, dar bazele științifice ale utilizării bacteriilor lactice în diferite preparate au fost puse de către Metchnikoff și Pasteur în secolul XIX. În 1940 interesul pentru compoziția microbiotei digestive a crescut datorită apariției antibioticelor. S-a constatat că includerea antibioticelor în hrana animalelor conduce la îmbunătățirea stării de sănătate a animalelor și implicit la creșterea performanțelor acestora. Dorința de a descoperi mecanismele care stau la baza acestor efecte a condus la studii mai amănunțite privind compoziția microbiotei intestinale și rolul acesteia în organsimul gazdă.

Dacă la început selecția de microorganisme cu potențial probiotic era realizată empiric, în ultimii ani se impune o analiză riguroasă pentru selecția acestora, analiză care include:

- utilizarea de microorganisme care sunt asimilabile microbiotei digestive;
- selecția de tulpini rezistente la pH și acizi biliari;
- să prezinte efecte benefice în ceea ce privește starea de sănătate a gazdei;
- abilitatea de a adera la celulele epiteliale ale mucoaselor;
- să fie nepatogene și netoxice;
- să fie stabile și capabile să colonizeze tractul digestiv;
- să prezinte viabilitate crescută;
- să poată fi cultivate la scară industrială.

BCU IAȘI LIBRARY

În ultimii ani, datorită răspândirii transferului de gene de rezistență la antibiotice în rândul populațiilor microbiene, numeroase studii s-au axat pe înlocuirea compușilor chimici utilizați ca promotori de creștere cu preparate de tip probiotic. Utilizarea preparatelor probiotice vizează câteva obiective majore cum ar fi:

- îmbunătățirea ratei de creștere a animalelor;
- îmbunătățirea ratei de conversie a hranei;
- creșterea rezistenței la microorganismele patogene;
- îmbunătățirea calității produselor animale (carne, ouă, lapte),

obiective care implică o creștere economică substanțială și în același timp o scădere a riscului de îmbolnăvire în rândul consumatorilor.

Rezulatele obținute sunt în general variabile și ele depind în mare masură de condițiile de creștere și vârsta animalelor, de utilizarea corectă a preparatelor probiotice și de dozele administrate.

Un factor esențial în ceea ce privește selecția și eficiența unui microorganism probiotic îl reprezintă compoziția microbiotei digestive a animalelor, de aceea prezentăm în continuare câteva aspecte privind anatomia și fiziologia tractului gastrointestial al animalelor și principalele caracteristici ale microbiotei de la nivelul acestuia.

9.6.2. Microbiota tractului digestiv la animale

Creșterea și dezvoltarea organismelor animale presupune ingerarea de nutrienți care în general sunt asimilați ca atare doar într-o mică proporție. Hrana, în cea mai mare parte este constituită din macromolecule ce necesită o serie de transformări pentru a putea fi asimilată. Aceste transformări sunt de natură fizică cum este în cazul masticației și a motricității tubului digestiv sau sunt de natură chimică, caz în care intervin două tipuri de enzime: enzimele secretate de glandele digestive și enzimele de origine microbiană, biosintetizate de microorganismele prezente la nivelul tubului digestiv.

În funcție de tipul de alimente consumate, animalele sunt grupate în: carnivore, ierbivore și omnivore.

La naștere tubul digestiv al animalelor este steril, dar foarte repede acesta este colonizat de microorganisme care vor intra în componența microbiotei digestive care are un rol foarte important în nutriția animalelor și va fi o componentă relativ stabilă în timp. Microbiota digestivă reprezintă un ecosistem activ metabolic, fiind potențial echivalentă ficatului.

În cazul animalelor ierbivore, degradarea celulozei - compus aflat în proporție mare în materialul vegetal - este în totalitate bazată pe enzimele (celulaze) secretate de microbiota prezentă la nivelul tubului digestiv.

Până în prezent nu au fost elucidate toate aspectele privind componența, diversitatea și funcția microbiotei de la nivelul tubului digestiv. De exemplu, la suine și păsări componenta dominantă este reprezentată de lactobacili.

Diversitatea ca și funcția acestui ecosistem activ depinde de o serie de factori cum ar fi: anatomia și fiziologia tractului digestiv, regimul alimentar, starea de sănătate a animalelor, tratamentele cu diverse medicamente, vârsta și starea de stres, care induce schimbări hormonale ce afectează secrețiile mucoaselor.

Cel mai important factor care influenţează compoziţia microbiotei îl reprezintă structura tubului digestiv (Tabelul 9.2)

Tabelul 9.2.

Elemente comparative privind structura şi funcţionalitatea tractului digestiv la om, câine şi oaie

Compartimente ale tractului digestiv	Om	Câine	Oaie
Cavitate bucală			
Mişcare	Verticală	Verticală	Circulară
Funcţie	Zdrobire	Zdrobire	Macinare
Masticaţia	Neimportantă	Neimportantă	Funcţie vitală
Rumegare	Niciodată	Niciodată	Funcţie vitală
Stomac			
Prezenţa bacteriilor	Nu	Nu	Da - vital
Prezenţa protozoarelor	Nu	Nu	Da - vital
Aciditate gastrică	Crescută	Crescută	Redusă
Digestia celulozei	Nu	Nu	70% vital
Activitate digestivă	Redusă	Redusă	Funcţie vitală
Colon şi cecum			
Dimensiunea colonului	Scurt	Scurt	Lung
Dimensiunea cecumului	Mic	Mic	Voluminos
Rect	Mic	Mic	Voluminos
Activitate digestivă	Nu	Nu	Funcţie vitală
Digestia celulozei	Nu	Nu	30% - vital
Microbiota	De putrefacţie	De putrefacţie	Fermentativă
Absorbtia nutrienţilor	Nu	Nu	Funcţie vitală
Eliminarea hranei în fecale	Rar	Rar	Cantitate mare
Activitate digestivă			
Pancreas	Totală	Totală	Parţială
Bacterii	Nu	Nu	Parţială
Protozoare	Nu	Nu	Parţială
Frecvenţa de alimentare	Intermitent	Intermitent	Continuu
Supravieţuire fără microorganisme	Posibilă	Posibilă	Imposibilă
Raport faţă de lungimea corpului			
Întreg tractul digestiv	1/5	1/7	1/27
Intestin subţire	1/4	1/6	1/25

Particularităţile metabolice, fiziologice şi regimul alimentar condiţionează parametrii fizico-chimici ai tubului digestiv şi implicit ecosistemul microbian. Particularităţile esenţiale sunt următoarele:

- motricitatea tubului digestiv responsabilă de tranzitul alimentar (viteza de tranzit descreşte de-a lungul intestinului);
- temperatura, care la animalele homeoterme este aceeaşi cu temperatura corporală;
- valorile de pH la nivelul diferitelor compartimente ale tubului digestiv;
- potenţialul oxido-reducător care descreşte de la stomac la cecum şi care reflectă condiţiile de aerobioză, respectiv anaerobioză;
- prezenţa enzimelor digestive, saliva, prezenţa sucului gastric, biliar şi pancreatic care modifică pH-ul la nivelul tractului digestiv şi favorizează transformarea alimentelor.

9.6.2.1 Particularităţi digestive la principalele clase de mamifere

Mamifere carnivore

Una dintre caracteristicile principale ale acestor animale o reprezintă lungimea tractului digestiv mult mai mică în comparaţie cu lungimea tractului digestiv al animalelor ierbivore, deoarece acestea consumă în general alimente bogate în substanţe nutritive uşor asimilabile şi sensibile la enzime.

Stomacul este voluminos şi secretă acid clorhidric şi pepsină care facilitează digestia proteinelor alimentare. Activitatea gastrică este responsabilă de absenţa relativă a microbiotei endogene la acest nivel (10^2 cel/g de conţinut). Diminuarea activităţii gastrice implică creşterea numărului de microorganisme până la o valoare de 10^4 cel/g de conţinut, în zona postpilorică.

La nivelul intestinului gros, duoden şi jejun datorită sărurilor biliare numărul de celule este de 10^4 cel/ml de conţinut. Bacteriile prezente la acest nivel sunt în special bacterii aerobe şi facultativ anaerobe. La partea distală a intestinului gros apare o creştere semnificativă a numărului de microorganisme, până la 10^7 - 10^8/ml de conţinut , iar bacteriile anaerobe devin predominante (Figura 9.1).

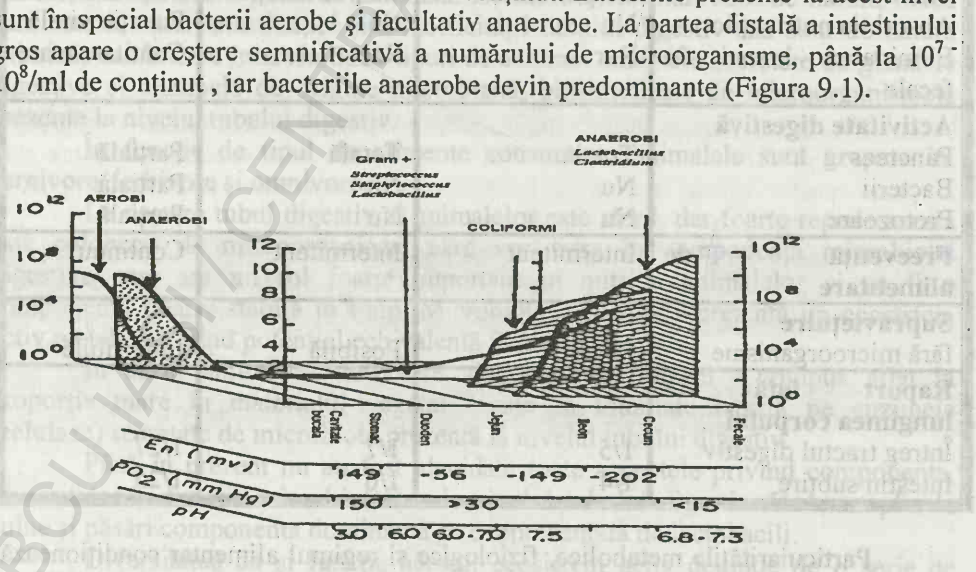


Figura 9.1. Distribuţia şi densitatea microbiotei digestive (după Guillot şi Ruckebusch, 1994)

Mamifere ierbivore monogastrice

Spre deosebire de animalele carnivore, animalele monogastrice au capacitatea de a asimila compuşii digestibili în părţile anterioare ale tubului digestiv, în timp ce compuşii nedigestibili cum ar fi celuloza, tranzitează tractul intestinal până la nivelul intestinului gros unde sunt supuşi acţiunii microbiotei celulozolitice şi proteolitice.

Capacitatea stomacului este mult diminuată, iar valorile relativ scăzute de pH (între 3 şi 4) inhibă proliferarea microorganismelor.

Microorganismele de la nivelul colonului şi cecumului sunt în număr foarte mare, predominând în general bacteriile facultativ sau strict anaerobe din genurile *Enterococcus*, *Bacteroides* şi *Lactobacillus*. Numărul de celule ajunge până la 10^{10} cel/g de conţinut cecal, din care 50% reprezintă microorganisme ce degradează celuloza şi aproximativ $2x10^5$ cel/g de conţinut microorganisme cu acţiune proteolitică. Microbiota strict anaerobă este la fel de importantă, dar dezvoltarea sa este limitată de concentraţia mare de acizi volatili eliberaţi în urma actvităţii celulozolitice şi proteolitice.

Animale ierbivore poligastrice

Speciile de ierbivore poligastrice prezintă un stomac multicompartimentat (patru compartimente – rumen, ciur, foios şi cheag), iar caracteristica principală o reprezintă faptul că digestia are loc la nivelul prestomacului în urma unei acţiuni mecanice şi microbiene.

Microbiota digestivă formată în special din tulpini aparţinând genului *Bacteroides*, se instalează rapid după naştere, rumenul fiind colonizat cu bacterii anaerobe a căror densitate ajunge la 10^9cel./ml de conţinut, în 2-4 zile. Bacteriile celulozolitice apar din a patra zi după naştere, iar numărul lor creşte progresiv până la 10^6-10^8 cel/ml de conţinut, până în cea de a şaptea zi. Alte bacterii care se găsesc la nivelul tractului digestiv al animalelor rumegătoare aparţin genurilor *Lactobacillus* şi *Enterococcus*. De la nivelul tractului digestiv al acestor animale au fost izolate 200 de tulpini, incadrate în 63 de specii, incluse în 39 de genuri. Microorganismele au fost grupate astfel:

→ ***bacterii celulozolitice*** (*Bacteroides succinogenes, Butyrovibrio fibrisolvens, Cillobacterium cellusolvens, Clostridium lochheadii, Ruminococcus (R.) albus, R. flavefaciens*)

→ ***bacterii amilolitice*** (*Bacteroides amylophilus, Bacteroides ruminicola, Enterococcus (E.) bovis, Selenomonas ruminantium, Succinomonas amylolytica*)

→ ***bacterii proteolitice*** (*Bacteroides amylophilus, Bacteroides succinogenes, Butyrovibrio sp., Corynebacterium sp., Methanobacterium ruminantium, Micrococcus sp., Proteus sp.*)

→ ***bacterii care fermentează laptele*** (*Butyribacterium limosum, Peptostreptococcus elsdenii, Veillonella alcalescens*)

→ ***bacterii metanogene*** (*Methanobacterium ruminantium*)

→ ***bacterii lactice*** (*Bifidobacterium (B.) bifidum, Eubacterium ruminantium, Lactobacillus (L.) acidophilus, L. brevis, L. buchneri, L. casei, L. cellobiosus, L. fermentum, L. delbrueckii ssp. lactis, L. plantarum*)

Protozoarele ciliate printre care tulpini aparținând genurilor *Entodinium* și *Polyplastron* apar în rumen atunci când animalele încep să utilizeze hrană solidă. Supraviețuirea și multiplicarea în rumen a acestor protozoare este influențată pe de-o parte de compoziția chimică a alimentelor, iar pe de altă parte și de microbiota deja existentă în acest compartiment (în mod special de microorganismele strict anaerobe care influențează dezvoltarea și multiplicarea acestor protozoare).

La nivelul rumenului microorganismele au trei nișe ecologice distincte: libere în lichidul ruminal, atașate peretelui ruminal, atașate particulelor alimentare.

Microbiota fixată pe peretele rumenului este formată în principal din bacterii facultativ anaerobe (genurile: *Staphylococcus, Micrococcus, Streptococcus, Fusobacterium*) și utilizează oxigenul din circulația sangvină menținând în același timp anaerobioza în rumen.

Bacteriile fixate pe particulele alimentare reprezintă o treime din populația microbiană totală și aparțin în general genurilor *Bacteroides* și *Ruminococcus*. Tulpinile din genul *Ruminococcus* prin structura peretelui celular permit contactul între celulă și celuloză, favorizând acțiunea enzimelor celulozolitice eliberate de acest tip de microorganisme.

Microbiota digestivă de la nivelul tractului intestinal al ierbivorelor poligastrice are rol și în detoxifiere, prin neutralizarea unor produși toxici prezenți la nivelul hranei.

Omnivore

Creșterea rapidă a acestui tip de animale al căror reprezentant este porcul indică faptul că, tractul digestiv al acestora reprezintă un instrument eficient de transformare a alimentelor în nutrienți asimilabili.

În cazul acestor animale acidul clorhidric secretat de stomac menține pH-ul la o valoare scazută (2-3), valoare optimă pentru acțiunea pepsinei și inhibă dezvoltarea microorganismelor. Pancreasul este principalul producător de enzime hidrolitice, care intervin în transformarea macromoleculelor de proteine, polizaharide și lipide în compuși asimilabili, cu structura chimică mai simplă.

Digestia la nivelul intestinului gros este în întregime dependentă de microbiota intestinală, iar eficiența ei depinde de cantitatea de compuși nedigestibili de la nivelul zonei ileo-cecale. Formarea microbiotei digestive începe de la naștere și majoritatea bacteriilor care intră în componența acesteia aparțin genurilor: *Lactobacillus, Bacteroides, Enterococcus, Escherichia* și *Clostridium*. Din punct de vedere microbiologic, caracteristica principală a animalelor omnivore o reprezintă numărul mare de lactobacili, care poate ajunge până la 10^7-10^8 cel/g de conținut în toate segmentele tubului digestiv. La nivelul duodenului și părții proximale a jejunului populația bacteriană este de 10^8 cel/g de conținut și crește până la 10^{11} cel/g de conținut la nivelul colonului. Balanța microbiană variază în diferitele segmente ale tubului digestiv, la nivelul porțiunilor distale ale

intestinului, în colon şi cecum predominând bacteriile strict anaerobe din genul *Bacteroides*.

9.6.2.2. Particularităţi digestive la păsări

Aparatul digestiv la păsări prezintă o serie de particularităţi anatomice şi funcţionale care implică o diferenţiere a acestora din punct de vedere fiziologic (figura 9.2).

Prezentăm în continuare câteva particularităţi anatomice şi fiziologice:

- prezenţa unei dilatări a esofagului – guşa;
- structurarea stomacului în două compartimente: un prim compartiment glandular, bogat în glande care secretă acid clorhidric şi pepsină în cantităţi mult mai mari decât în cazul carnivorelor şi un al doilea compartiment muscular al cărui perete este cheratinizat şi contribuie la triturarea hranei;
- segmentul distal al tubului digestiv prezintă două cecumuri şi la acest nivel are loc fermentaţia proteinelor şi celulozei, urmată de absorbţia aminoacizilor în proporţie de 10%.

În cazul păsărilor studiile realizate au demonstrat faptul că în microbiota digestivă predomină lactobacilii, care la nivelul guşei sunt responsabili de fermentaţia glucidelor şi ajung până la 10^9cel/g de conţinut. Alte tipuri de microorgansime întâlnite la nivelul tractului digestiv aviar sunt enterococii, colibacilii (10^5 cel/ml de conţinut), ocazional streptococi, micrococi şi levuri. Spre deosebire de guşă, în partea proximală a tubului digestiv datorită pH-ului acid şi tranzitului alimentar microbiota nu este foarte bine dezvoltată, dar pe masură ce valorile de pH devin favorabile (pornind de la joncţiunea ileo - colică) şi tranzitul intestinal mai lent, numărul microorganismelor creşte.

La nivelul cecumului condiţiile de dezvoltare a microorganismelor sunt optime pH 6,7 până la 7,5 şi anaerobioză, ceea ce conduce la o populaţie microbiană de 10^9-10^{10} cel/g de conţinut, formată din bacterii strict anaerobe nesporulate (*Bacteroides sp., Fusobacterium russi, Eubacterium sp., Peptostreptococcus sp., Streptococcus sp.*), bacterii strict anaerobe sporulate (*Clostridium (Cl.) malenominatum, Cl. tertium, Cl. sartagormum, Cl. bifermentas,Cl. sordelli*) şi bacterii facultativ anaerobe (*E. faecalis ssp. liquefaciens şi ssp. zymogenes, E. coli*). La acest nivel microbiota este formată în special din bacterii strict anaerobe, lactobacili, colibacili şi enterococi, iar 50% este constituită din bacterii strict anaerobe nesporulate, coci şi clostridii care descompun acidul uric. Dintre reprezentanţii bacterieni care descompun acidul uric, pot fi menţionaţi: *Lactobacillus sp.* şi *Enterococcus faecium* (facultativ anaerobi); *Bacteroides vulgatus, Bacteroides hypermegas, Fusobacterium sp., Streptococcus (Str.) intermedius, Str. pleomorphus, Coprococcus sp., Peptostreptococcus sp., Eubacterium sp., Propionibacterium acnes, Bifidobacterium sp., Gemmiger formiciles* (anaerobi nesporulaţi) şi *Clostridium perfringens, Cl. symbiosum* (anaerobi sporulaţi). În primele ore puii de pasăre prezintă o microbiotă digestivă compusă în special din *E. coli* şi enterococi, după care apar şi lactobacilii, iar după

două saptămâni de viaţă apar bacteriile proteolitice. Vitaminele din hrană sunt utilizate de microbiota bacteriană, care însă are capacitatea de a sintetiza o serie de vitamine, în special cele din grupa B, ce vor fi asimilate de organismul gazdă.

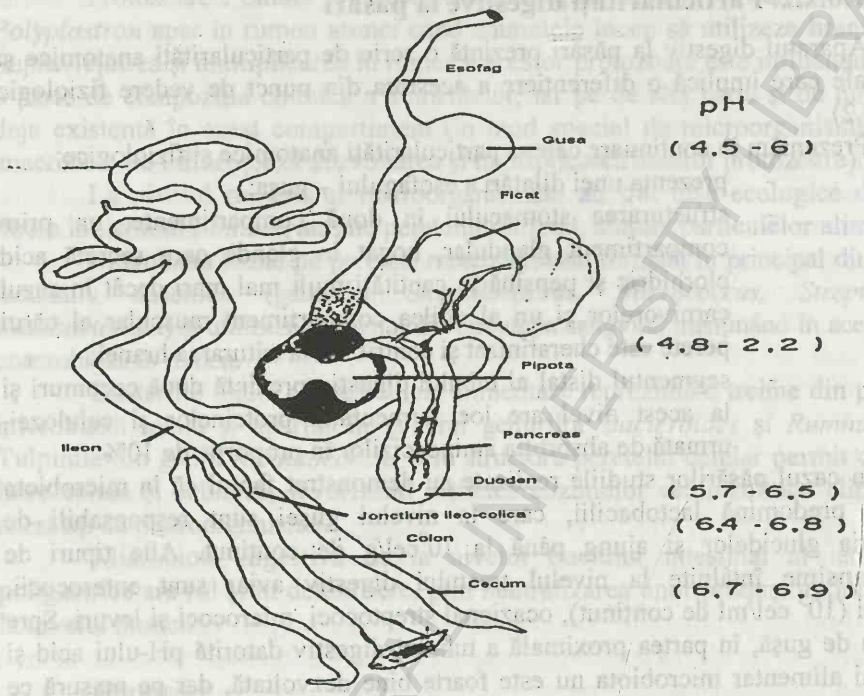
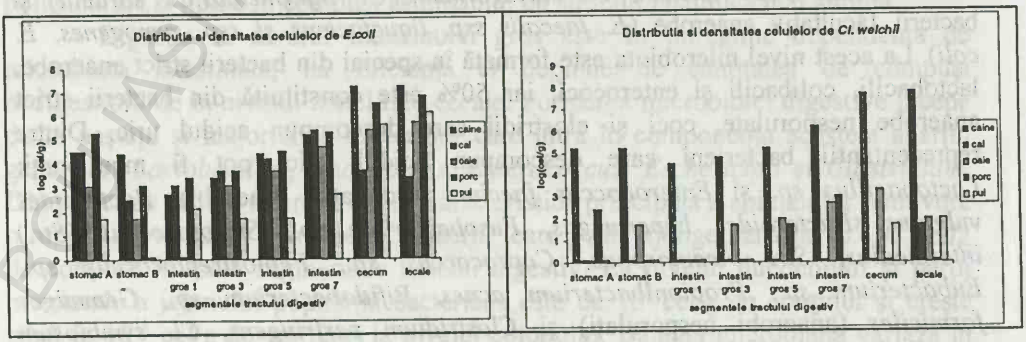


Figura 9.2. Aparatul digestiv la păsări

Parametrii prezentaţi în cadrul acestui capitol referitori la anatomia şi fiziologia digestivă, care diferă de la o clasă la alta de animale şi uneori chiar în cadrul aceleaşi clase, au un rol deosebit de important în distribuţia şi compoziţia microbiotei digestive (figura 9.3), alături de alţi factori ca: regimul alimentar, regimul climatic, starea de sănătate a animalelor, condiţiile de stres, vârsta etc.



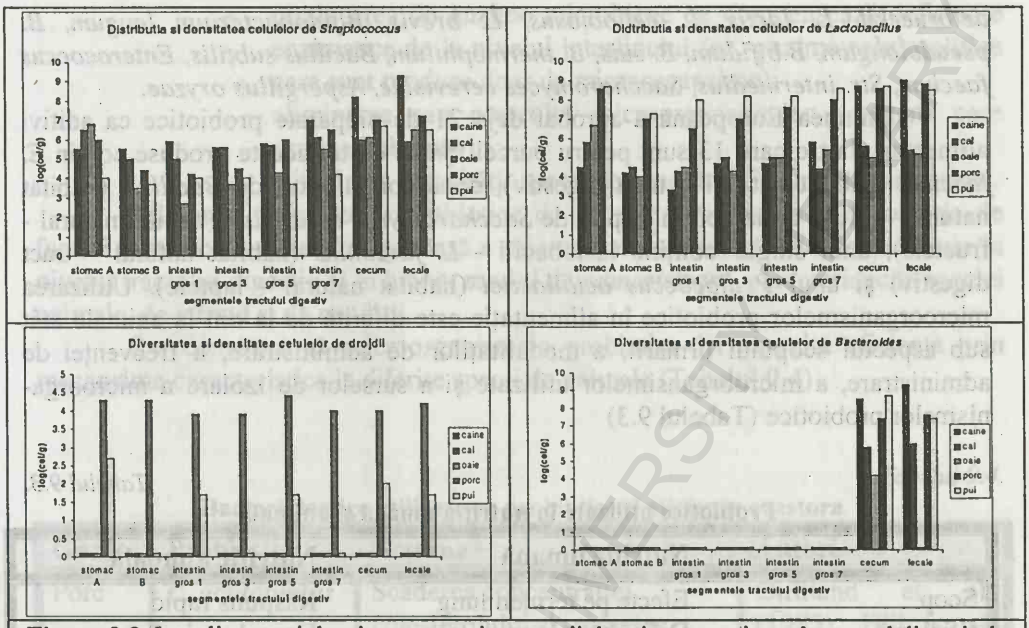


Figura 9.3. Localizarea şi densitatea anumitor specii de microorganisme în tractul digestiv la cateva specii de animale

Legenda: Stomac A- partea anterioară a stomacului, stomac B - partea inferioară a stomacului, intestin gros 1- colon ascendent, intestin gros 3- colon transvers, intestin gros 5 – colon descendent, intestin gros 7- rect.

9.6.3. Caracteristicile probioticelor de uz zootehnic

Studii recente privind rolul esenţial pe care-l are microbiota digestivă în păstrarea stării de sănătate a gazdei, au evidenţiat faptul că echilibrul microbian, relativ sensibil, poate fi manipulat în vederea creşterii performanţelor zootehnice.

Deşi în ultimele decenii antibioticele, denumite promotori de creştere, au fost frecvent utilizate ca aditivi alimentari pentru diferite animale de fermă, experimentele recente au demonstrat rolul acestora în destabilizarea microbiotei digestive şi în aparţia de tulpini bacteriene cu rezistenţă la antibiotice. Acest lucru a condus la iniţierea cercetărilor în vederea testării altor compuşi cu efecte benefice ca alternativă la antibiotice. Printre «alternativele la antibiotice» se numără probioticele, prebioticele, acizii organici, plantele şi uleurile esenţiale.

Uniunea Europeană a sesizat de câţiva ani riscul folosirii antibioticelor şi a propus interzicerea antibioticelor ca aditivi începând cu 1 ianuarie 2006. Condiţiile privind identificarea, caracterizarea şi evaluarea probioticelor ca aditivi alimentari au fost stabilite în Directiva Consiliului European 87/153/EEC, modificată prin alte două directive : 94/40/EC şi 95 /11 /EC.

Microorganismele probiotice care au avut efecte promiţătoare în ceea ce priveşte starea de sănătate animală şi îmbunătăţirea ratei de creştere a acestora sunt: *L. acidophilus, L. casei, L. fermentum, L. plantarum, L. salivarius, L. reuteri, L.*

delbrueckii, L. lactis, L. cellobiosus, L. brevis, Bifidobacterium longum, B. pseudolongum, B.bifidum, B. suis, B. thermophilum, Bacillus subtilis, Enterococcus faecium, Str. intermedius, Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus oryzae.

Uniunea Europeană a aprobat deja 21 de preparate probiotice ca aditivi alimentari dintre care 13 sunt pentru purcei. Şapte dintre aceste produse conţin *E. faecium* (habitat natural – tract digestiv), două conţin spori de *Bacillus* (habitat natural - solul), două conţin tulpini de *Saccharomyces cerevisiae* (habitat natural - fructele), unul singur conţine lactobacili - *L. farcimins* (habitat natural – tract digestiv) şi unul *Pediococcus acidilactici* (habitat natural - laptele). Utilizarea microorganismelor probiotice în alimentaţie este diferită de la om la animale atât sub aspectul scopului urmărit, a modalităţilor de administrare, a frecvenţei de administrare, a microorgansimelor utilizate şi a surselor de izolare a microorganismelor probiotice (Tabelul 9.3)

Tabelul 9.3.

Probiotice utilizate în nutriţia umană şi animală

	Nutriţie umană	Nutriţie animală
Scop	Efecte pe termen lung	Răspuns rapid
Eficienţă	Dificultăţi de asimilare	Uşor de asimilat
Modalităţi de administrare	In combinaţie cu porţiuni mici de hrană	Ca aditivi amestecaţi în hrană
Frecvenţa de administrare	O dată sau de mai multe ori pe zi	De 10 până la 20 de ori pe zi
Cele mai frecvente microorganisme	*Lactobacillus sp.* *Bifidobacterium sp.* *Entercococcus sp.*	*Enterococcus faceium* *Bacillus sp.* *Saccharomyces cerevisiae*
Habitat natural	Tract digestiv, produse lactate	Tract digestiv, sol, fructe

Principalele efecte urmărite prin administrarea preparatelor de tip probiotic de uz zootehnic sunt: intensificarea ratei de creştere a animalelor, reducerea morbidităţii şi mortalităţii, reducerea riscului îmbolnăvirii animalelor şi indirect a consumatorului de produse animale.

Aceste efecte se obţin prin:

- amplificarea ratei de conversie a hranei;
- absorbţia mai bună a nutrienţilor prin controlul microbiotei digestive;
- îmbunătăţirea metabolismului glucidelor ca şi a sintezei de vitamine;
- neutralizarea şi predigestia anumitor compuşi cum ar fi: inhibitori de tripsină, acid fitic;

- producerea de enzime microbiene ce compensează deficienţe enzimatice de la nivelul intestinului (ex. enzime celulozolitice care sunt produse doar de microorgansime);
- eliminarea sau controlul microorgansimelor patogene care produc îmbolnăviri;
- stimularea imunităţii specifice şi nespecifice la nivel intestinal.

Eficienţa preparatelor probiotice de uz zootehnic depinde de o serie de factori dintre care: ***selecţia*** riguroasă a microorgansimului, ***stabilitatea*** acestuia la nivelul tractului digestiv şi în hrană, ***modul de administrare***, caracteristicile speciei animale, de ***vârstă*** şi de condiţii.

S-a constatat că microorganismele probiotice îşi exercită eficienţa prin mecansime caracteristice la diferite specii de animale (Tabelul 9.4)

Tabelul 9.4.

Bacterii lactice utilizate ca probiotice şi eficienţa acestora

Gazda	Probiotic	Acţiune	Autori
Porc	*L. acidophilus*	Scăderea concentraţiei colesterolului şi aminelor	Gilliland et al. (1985), Hill et al. (1970a)
Viţel	*L. acidophilus*	Formarea de acizi biliari inhibitori	Gilliland and Speck (1977)
Om	*L. acidophilus*	Reducerea numărului de compuşi carcinogeni	Goldin et al. (1980, 1984)
Şoareci	*L. bulgaricus*	Producerea de enzime hidrolitice	Gravie et al. (1984)
Pui	*L. acidophilus*	Îmbunătăţirea digestiei	Champ et al. (1983)

Una din condiţiile pe care un preparat probiotic trebuie să le îndeplinească vizează viabilitatea şi numărul microorganismelor care intră în compoziţia acestora, precum şi stabilitatea în diferite condiţii cum ar fi temperatura, pH, prezenţa sărurilor biliare etc. Lactobacilii şi bifidobacteriile sunt mai puţin utilizaţi ca aditivi alimentari pentru zootehnie tocmai datorită stabilităţii scăzute în timpul procesului de hrănire şi de stocare. Cele mai stabile microorganisme utilizate ca probiotice sunt cele din genul *Bacillus*, ai căror spori sunt rezistenţi la şocul termic şi sunt stabili chiar în cazul stocării pe termen lung. De exemplu *Bacillus cereus toyoi* a fost recuperat în proporţie de 95% în urma unui şoc termic de 87^0C şi în proporţie de 92% după stocarea timp de 8 săptămâni. Celulele deshidratate de *E. faecium* sunt mult mai sensibile la şocul termic şi se inactivează în proporţie de 50% în urma stocării timp de 8 săptâmani (figura 9.4).

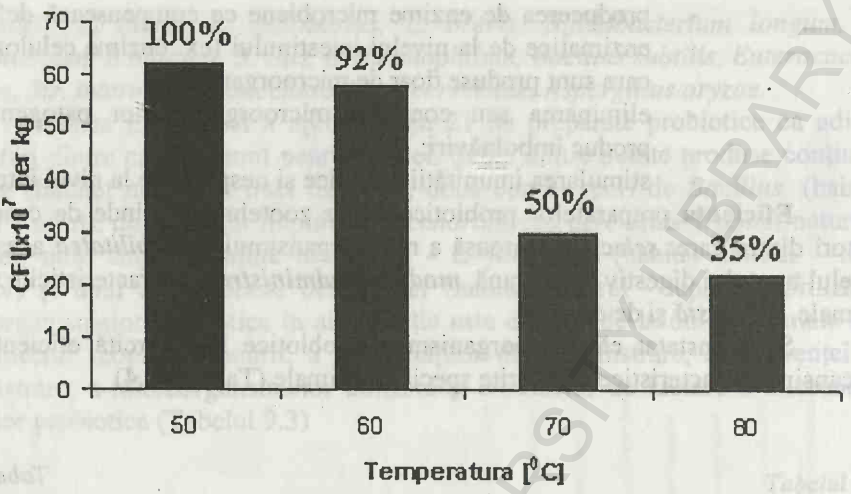


Figura 9.4. Viabilitatea celulelor de *Enterococcus faecium* în urma şocului termic

Lipsa stabilităţii poate fi compensată prin creşterea concentraţiei iniţiale administrate. Este foarte greu de urmărit prin metode microbiologice de rutină, tranzitul intestinal al celulelor de *Enterococcus* şi *Lactobacillus*, dar în ultimii ani s-au pus la punct metode genetice de evidenţiere a acestora (sonde ARN şi ADN).

Modul de administrare şi modul de condiţionare a produselor probiotice este variabil. Marea majoritate a preparatelor de probiotice sunt sub formă de pudră care se administrează o dată sau de două ori pe zi prin mixare în hrana animalelor. Există însă şi preparate probiotice sub formă lichidă, de capsule sau gel care sunt administrate oral. Dozele administrate sunt dependente de numărul de celule vii din preparatul probiotic, de vârsta şi condiţiile de sănătate a animalelor şi de stabilitatea în timp a preparatului probiotic. Pentru microorganismele a căror viabilitate scade în timp şi în condiţii de stocare se recomandă creşterea dozei de preparat probiotic.

În ceea ce priveşte influenţa vârstei şi a condiţiilor în care se recomandă administrarea de probiotice prezentăm în continuare câteva cazuri în care a fost dovedită eficienţa preparatelor probiotice.

La viţei: - dupa naştere sau după înţărcare - înainte şi după transportul acestora - dupa exces de hrană sau tratament cu antibiotice	**La vaci:** - tratament cu antibiotice - dificultăţi în timpul gestaţiei - cetoza
La purcei : - după naştere şi înţărcare - când sunt sub greutatea medie - după tăierea cozii şi castrare - probleme gastrointestinale	**La porci:** - după tratament cu antibiotice - în timpul şi după transport

Spre deosebire de om, în cazul animalelor efectele probioticelor pot fi testate eficient prin experimente în *vivo* folosindu-se diferite modele animale. Conceptul de animal axenic ("germ-free") a fost enunţat de Pasteur (1885), care considera ca viaţa animalelor este imposibilă în absenţa microorganismelor. Abordările experimentale ale lui Thierfelder şi Nuttall (1895) au invalidat concepţiile lui Pasteur. Reyniers (1949) a stabilit condiţiile tehnice speciale pentru obţinerea animalelor gnotobiotice.

Terminologia utilizată în studiile de gnotobiologie a fost propusă de Reyniers (1949) şi completată de Luckey (1965) şi Gordon şi Pesti (1971).

Gnotobiotic (gr. *gnotos* = cunoscut) este animalul scos prin intervenţie cezariană sau ecloziune sterilă din ou, crescut şi menţinut continuu în condiţii de izolator, prin tehnici "germ-free".

Gnotofor - animal purtător al unei (unor) specii cunoscute de microorganisme inoculate în mod deliberat.

Axenic (steril sau *germ-free*) - animal lipsit de orice microorganism viabil.

Monognotofor - animal axenic, inoculat cu o singură specie cunoscută de microorganisme.

Dignotofor - animal axenic inoculat cu două specii de microorganisme cunoscute.

Gnotobiologie - biologia sistemelor în care sunt prezente numai specii cunoscute.

Convenţional sau ***holoxenic***- animal crescut în condiţii obişnuite, în mediu deschis, care conţine *microorganismele asociate* tegumentelor şi mucoaselor;

Conventionalizate - animal axenic, trecut ulterior în condiţii de viaţa liberă.

SPF ("*S*pecific *p*athogen *f*ree") - animale purtătoare ale unei microbiote convenţionale normale, în absenţa oricărui microorganism patogen cunoscut.

Obţinere. Mamiferele "sterile" se obţin prin intervenţie chirurgicală cezariană, în spaţiu steril, urmată de histerectomie şi transferul uterului în camera sterilă a unui izolator, în care este eliberat nou născutul. Ouăle aflate la sfârşitul perioadei de incubare sunt supuse unei băi germicide, iar ecloziunea are loc într-un dispozitiv sterilizat.

Sistemul izolator de creştere este alcătuit din mai multe compartimente ermetic închise. Fluxurile de aer, hrană şi apă sunt sterilizate.

Au fost crescute în condiţii axenice, gândaci şi melci, raţe, găini şi prepeliţe, şoareci, şobolani, cobai, iepuri, oi, câini, porci, bovine, maimuţe şi ponei. Ele au fost păstrate în condiţii de sterilitate microbiologică mai multe generaţii, cu un comportament aparent normal.

Aceste modele animale sunt utilizate cu succes atât în stabilirea rolului anumitor microorgansime în funcţionarea normală a microbiotei digestive, în determinrea efectelor microorganismelor patogene, cât şi în stabilirea mecanismelor şi efectelor microorgansimelor probiotice.

O serie de astfel de studii în *vivo* au vizat stabilirea eficienței probioticelor în cazul purceilor (figura 9.5), eficiență care variază însă destul de mult, creșterea în greutate fiind semnificativă doar în anumite cazuri.

Trebuie însă subliniat faptul că probioticele nu acționează ca nutrienți esențiali, ci intervin prin modificări la nivelul microbiotei digestive, iar aceste modificari depind foarte mult de statusul animalului și variază de la individ la individ.

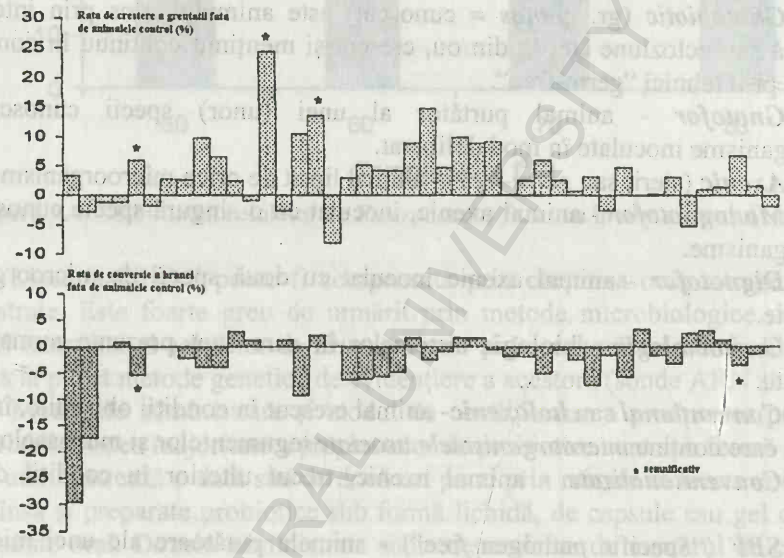


Figura 9.5. Efectul relativ al probioticelor în ceea ce privește îmbunătățirea ratei de creștere și conversia hranei (exprimat procentual față de animalele control). (dupa Ortwin Simon, 2005)

Pe plan mondial în cadrul Comunității Europene, încă din 1980, existau peste 20 de preparate probiotice de uz zootehnic și veterinar, având la bază biomasă microbiană aparținând genurilor *Saccharomyces, Lactobacillus, Bacillus, Pedioccocus*, ca de exemplu: Cocbactin (Olanda), Ordin (Germania), Proterin (Anglia), Acobil (Franța).

În prezent cercetările privind probioticele cunosc noi direcții de dezvoltare. Astfel, firme renumite din SUA (*All-Tech-INC*), Japonia (*Toya Co. LTD*), Franța (*Santel*), Anglia (*Probiotics-INU*), Germania (*Chevita-GmbH*) au reușit să obțină preparate eficiente conținând agenți de tip probiotic, destinați industriei alimentare, farmaceutice și pentru zootehnie.

Exemple de produse probiotice de uz zootehnic şi caracteristicile acestora

BioPlus 2B (Novartis Animal Health) – probiotic pentru porci, pui şi vite – produs aprobat de Uniunea Europeană.

Ingrediente: spori de *Bacillus licheniformis* CH 200 – $1,6x10^6$ spori/g, spori de *Bacillus subtilis* CH201 $1,6x10^6$ spori/g, zer pudră şi silicat de sodiu siliconat.

Mod de prezentare - pudră

Mod de adimistrare: prin mixare cu hrană.

Cazuri în care se recomandă: la animalele mici dupa înţărcare, după schimbarea dietei animalelor, în timpul transportului animalelor, în condiţii de stres, după intervenţii chirurgicale, condiţii nefavorabile de climă şi îmbolnăviri.

Doze :

Purcei: 0.4 - 1 kg /t hrană
Porci pentru îngrăşare: 0.15 - 0.4 kg/t hrană
Pui: 1.0 kg/t hrană
Viţei: 0,4 - 0,5 kg/t hrană

Efecte benefice: prin colonizarea tractului digestiv şi producerea de amilaze, proteaze şi lipaze tulpinile de *Bacillus* contribuie la îmbunătăţirea digestiei, preparatul creşte rezistenţa animalelor la microorganisme patogene prin reducerea pH-ului şi creearea de condiţii nefavorabile dezvoltării acestora, prin îmbunătăţirea ratei de creştere.

Gener – Gel Bovine Pro55 (Bio -Vet) – **probiotic pentru vite**

Ingrediente: uleiuri vegetale, vitamina E, sucroză, celule viabile microbiene (*Sacharomyces cerevisiae, Propionibacterium freudenreichii, L. acidophilus, L. casei, E. faecium, L. lactis, Pediococcus cerevisiae, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis*) – $3,7x10^9$ CFU, α amilaze (*A. oryzae, A. niger*), protease (*A. oryzae, A. niger*), maltodextrine, silicondioxid

Mod de prezentare - gel

Mod de adimistrare: prin mixare cu hrană sau prin ingerare orală

Cazuri în care se recomandă: dificultăţi la naştere, transport, boli intestinale şi disfuncţionalităţi metabolice sau şoc termic. Poate fi utilizat în combinaţie cu terapia veterinară sau cu chirurgia pentru: diaree, acidoză ruminală, atonie ruminală, cetoză, mastite toxice, pneumonie.

Doze: o dată sau de două ori pe zi, timp de trei zile
-pentru animalele tinere se foloseşte doza de 10 ml , iar pentru vitele adulte 15ml

Efecte benefice: colonizarea rumenului cu *Propionibacterium* care reduce aciditatea şi concentraţia de nitrat; aport suplimentar de vitamine şi enzime datorită celulelor de drojdii din preparat, îmbunătăţirea ratei de creştere, reducerea efectele datorate stresului.

RumenAider Jr. (Bio -Vet)- **probiotic pentru viței**

Ingrediente: niacina, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, biotina, pantotenat de calciu, acid folic, riboflavina, tiamina, vitamina B12, acid ascorbic, drojdii îmbogățite cu selenium, zinc proteinat, celulaze (din *Trichoderma viridae, A. oryzae, A. niger*), lipaze (*A. niger*) amilaze (*A. oryzae, A. niger, Bacillus subtilis*), β-glucanaze (*Trichoderma longibrachiatum*), extract de rădăcină de cicoare, proteinat de mangan, proteinat de cupru, proteinat de cobalt, celule viabile microbiene (*Saccharomyces. cerevisiae, Propionibacterium freudenreichii, L. acidophilus, L. casei, E. faecium, L. lactis, Pediococcus dextrinicus*) – $22,5x10^9$ CFU, α-amilaze (*A. oryzae, A. niger*), proteaze (*A. oryzae, A. niger*), maltodextrine, silicondioxid

Mod de prezentare - capsule

Mod de adimistrare: prin ingerare orală

Cazuri în care se recomandă: schimbarea nutriției prin înțărcare, apetit scăzut, transport, boli intestinale și disfuncționalități metabolice sau șoc termic. Poate fi utilizat în combinație cu terapia veterinară sau cu chirurgia pentru diaree și pneumonie.

Doze: câte o capsulă, o dată sau de două ori pe zi timp de trei zile

Efecte benefice: colonizarea rumenului cu *Propionibacterium* reduce aciditatea și concentrația de nitrat; aport suplimentar de vitamine și enzime. Tulpiniile de drojdii îmbunătățesc fermentația de la nivelul rumenului și cresc apetitul. Vitaminele și mineralele îmbunătățesc activitatea sistemului imunitar.

Gener –Gel Equine Microbial Paste(Bio -Vet) – **preparat probiotic pentru cai**

Ingredienete: ulei vegetal, sucroză, biotină, celule vii de microorganisme (*S. cerevisiae, L. acidophilus, L. casei, L. lactis, E. faceium, Pediococcus dextrinicus, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis*) 2 $x10^9$ CFU, α–amilaze (din *A. oryzae, A. niger*), proteaze (din *A. oryzae, A. niger*).

Mod de prezentare – gel

Mod de administrare – administrarea se face prin amestecarea gelului cu hrana sau prin administrare orală, o dată sau de două ori pe zi

Doze:: 5ml pentru mânz, 5-10 ml pentru calul în vârstă de un an și 10ml pentru adulți.

Efecte benefice : menținerea apetitului, stabilizarea digestiei, optimizarea programelor de nutriție, reducerea consecințele stresului.

Protexin (Protexin Animal Health) – **probiotic pentru cai** (conține *L. delbrueckii ssp. bulgaricus, L. acidophilus, L. plantarum, L. rhamnosus, Bifidobacterium bifidum, E. faecium, Candida pintolepesii*)

Alte produse probiotice: ***Entravian*** *(Vydex Animal Health Ltd),* ***Avipro*** *(VetArk Health)* – probiotic pentru păsări, ***Enterodex*** *(Vydex Animal Health Ltd)*- probiotic pentru păsări, ***Fastrack*** *(Conklin)*- probiotic pentru pisici, etc

În ultimii ani terapia cu probiotice la om şi animale a luat amploare şi o serie de produse probiotice sunt comercializate, de asemenea; deoarece nu sunt medicamente, verificarea acestora sub aspectul calităţii şi eficienţei nu este foarte riguroasă. Un număr foarte mare de publicaţii ştiinţifice au remarcat faptul că, în general etichetele produselor probiotice nu conţin informaţii privind microorganismele şi nici numărul acestora din compoziţia produsului. Dintre 44 de produse analizate de către J. Scott Weese în 2003 (21 de uz uman şi 23 de uz veterinar) 40 aveau înscris pe etichetă că au în compoziţie unul sau mai multe microorganisme, dar informaţiile erau destul de vagi cum ar fi de exemplu «cultură de lactobacili sau cultură probiotică». Numai 2 produse de uz uman şi 2 de uz veterinar prezentau informaţii despre microorganisme până la nivel de specie. Cel mai frecvent microorganism menţionat pe etichete (75% din produse) este *L. acidophilus* în timp ce 27% din produse menţionau în componenţa lor *E. faecium*. În cazul unora dintre produse microorganismul menţionat nu exista în literatura de specialitate şi pentru produsele probiotice de uz veterinar lipseau informaţiile legate de doza de administrare la diferite animale (exemplu doza de *L. rhamnosus* GG este de $5x10^{10}$CFU pentru câine şi $3x10^{11}$ CFU/doză pentru cai).

O altă problemă o reprezintă lipsa informaţiilor privind numărul de celule viabile şi termenul de valabilitate, dat fiind că eficienţa unui produs de tip probiotic depinde în mare masură de numărul microorganismelor ingerate. Numai 76% din produsele de uz uman şi numai 22% din cele de uz veterinar menţionau numărul de microorganisme şi numai 2 produse aveau termenul de valabilitate înscris pe etichete.

În concluzie este necesară o verificare riguroasă a produselor probiotice comercializate atât din punct de vedere al calităţii, cât şi al informaţiilor înscrise pe etichete.

9.7. PROBIOTICE DE UZ MEDICAL

9.7.1. Probiotice pentru nou-născuti şi copii

Infecţiile intestinale la copiii nou-născuţi sunt foarte frecvente, iar în ţările în curs de dezvoltare diareea este principala cauză a morbidităţii şi mortalităţii. Enterocolita necrotică, una dintre cele mai frecvente boli, este caracterizată prin balonări abdominale, apnee şi bradicardie şi în cazurile grave se poate ajunge la şoc septic şi necroză intestinală. Această boală, cu rată a mortalităţii cuprinsă între 20-30% apare la aproximativ 25% din copii născuţi prematur. O parte din cazuri necesită intervenţie chirurgicală, iar pe termen lung copiii pot prezenta obstrucţie intestinală sau chiar disfuncţii la nivelul plămânilor şi altor organe. Microorganismele care determină apariţia acestei boli aparţin genurilor *Clostridium, Escherichia, Klebsiella, Salmonella, Shigella, Campylobacter, Streptococcus, Pseudomonas, Enterococcus* şi *Staphylococcus.*

Dacă copiii sunt hrăniţi cu lapte matern şi microbiota acestora conţine în principal microorganisme nepatogene, cum ar fi lactobacili şi bifidobacterii, incidenţa enterocolitei necrotice scade considerabil.

Microbiota nou-născuţilor prematuri poate fi dominată de o serie de patogeni cum ar fi *Enterococcus faecalis, E. coli, Staphylococcus epidermidis, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae* şi *Staphylococcus haemolyticus. Cl. perfringens* a fost izolat de la 40% din copiii care prezentau enterocolită necrotică. Analizele efectuate în cazul a 25 de copii cu enterocolită necrotică comparativ cu 23 de copii sănătoşi au evidenţiat faptul că există diferenţe majore în ceea ce priveşte prezenţa lactobacililor la nivelul microbiotei digestive: pentru copiii sănătoşi proporţia lactobacililor a fost de 48%, iar pentru cei bolnavi de 12%. Această observaţie sugerează o corelaţie între reducerea numărului de lactobacilli şi creşterea incidenţei riscului de instalare a enterocolitei necrotice.

O serie de alte studii au vizat influenţa bifidobacteriilor asupra stării de sănătate a gazdei, atât prin excluderea microorganismelor patogene cât şi prin modularea sistemului imunitar. Unul dintre cele mai concludente experimente a fost realizat în Columbia în cadrul unui studiu clinic pe 1282 de copii nou născuţi cărora li s-a administrat în lapte un supliment de $2,5x10^8$ celule viabile/doză de *L. acidophilus* şi $2,5x10^8$celule viabile de *Bifidobacterium infantis*. Rezultatele obţinute au fost comparate cu cele 1282 de cazuri existente în anul anterior şi s-a constatat o scădere cu 60% a cazurilor de enterocolită necrotică la copii cărora le-a fost administrat preparatul probiotic.

În cazul administrării de $6x10^9$celule viabile /doză de *Lactobacillus sp. GG* unor copii născuţi prematur sau care aveau greutate scăzută la naştere (<1500g), rezultatele privind rata de incidenţă a enterocolitei necrotice nu au fost relevante (2,7% pentru copiii din lotul de control şi 1,4% pentru copiii cărora li s-a administrat probiotic). Deşi eficienţa acestei tulpini probiotice în cazul prevenirii enterocolitei este scăzută comparativ cu a amestecului de *L. acidophilus* şi *B. infantis*, totuşi tulpina acţionează eficient în prevenirea incidenţei dermatitelor alergice prin modularea activităţii sistemului imunitar. Rata cazurilor de dermatită alergică a scăzut de la 46% la 23% în cazul în care mamelor însărcinate şi ulterior copiilor nou-născuţi le-a fost administrat *Lactobacillus sp.* GG. Răspunsul imun la nivelul tractului gastrointestinal este reprezentat de un echilibru între eliberarea de citochine proinflamatorii (ex. interleukina-1, -6 şi -8) şi citochine antiinflamatorii (ex. interleukina 1RA, -4 şi -10). Microorganismele probiotice pot influenţa starea de sănătate a gazdei prin modularea acestei balanţe.

Evidenţierea efectului probiotic s-a realizat şi în cazul tulpinilor de *L. rhamnosus* GG şi *B. lactis* B-12 utilizate pentru prevenirea diareei acute cauzate de rotavirusuri şi, respectiv *L. reuterii* SD2222 pentru tratamentul acestei afecţiuni. Testarea tulpinii de *L. rhamnosus* a fost realizată în mai multe studii clinice care au demonstrat reducerea semnificativă a duratei bolii şi nu s-au înregistrat nici un fel de efecte secundare. Rezultate similare s-au evidenţiat şi pentru tulpina de *L. reutei* administrată (10^{10} până la 10^{11} cel/ doză) unor copii în vârstă de până la 36 de luni

spitalizaţi cu diaree acută, dintre care 75% din cazuri au fost determinate de rotavirusuri.

Toate aceste studii au demonstrat faptul că administrarea de 1 sau 2 tulpini probiotice sub formă de capsule sau în lapte este recomandată în cazul prevenirii şi tratamentului diareei, ca şi a altor boli la copii.

9.7.2. Mecanismele prin care probioticele reduc durata şi efectele diareei

Au fost propuse o serie de mecansime pentru a explica efectul probiotic al tulpinilor în reducerea duratei diareei produse de rotavirusuri.

Un prim mecansim propus îl reprezintă blocarea competitivă a receptorilor, prevenind aderenţa şi invazia virusurilor în celulele intestinale. Această ipoteză pare plauzibilă, dar deocamdată nu există dovezi ale competiţiei la nivelul receptorilor specifici. Virusurile şi/sau toxinele NSP4 inhibă transportul fluidelor şi electroliţilor scăzând absorbţia de glucoză şi lichide, activează potenţialele reflexe secretorii conducând la diaree. În cazul în care, conform acestei ipoteze, lactobacilii competiţionează cu toxina sau proteinele eliberate de celulele endocrine, transformările care coduc la diaree ar putea fi prevenite.

Un al doilea mecanism potenţial de acţiune al probioticelor îl reprezintă amplificarea răspunsului imun de către lactobacili, ipoteză susţinută de efectul protector pe care anticorpii de tip sIgA îl exercită faţă de rotavirusuri (efect de excludere imună). O problemă în ceea ce priveşte această teorie constă in faptul că lactobacilii ar trebui să acţioneze prin stimularea rapidă a sistemului imunitar al mucoasei intestinale, care să interfere ulterior cu activitatea virală. Studiile *in vivo*, au evidenţiat o creştere a secreţiei de sIgA în prezenţa lactobacililor, dar nu există încă date concrete privind rata de stimulare.

Creşterea concentraţiei citochinelor anti-inflamatorii sau atenuarea efectului virusului şi/sau toxinelor acestuia la nivelul sistemului nervos enteric poate determina încetarea secreţiei epiteliale şi conduce la diaree. Un alt aspect care trebuie elucidat este de ce lactobacilii, care sunt prezenţi la nivelul intestinului copiilor par să fie incapabili să prevină infecţia, în timp ce administrarea orală ajută la îmbunătăţirea stării de sănătate.

O a treia ipoteză privind mecanismul de acţiune al probioticelor implică existenţa unui semnal datorat lactobacililor, care reglează secreţia şi motricitatea intestinală a gazdei. S-a constatat că expresia genelor MUC2 şi MUC3 (gene care codifică sinteza mucinelor intestinale) este stimulată de lactobacilli. Mucinele glicozilate intestinale sunt implicate în mecanismele de apărare ale organismului şi conferă protecţie celulelor intestinale prin împiedicarea aderării bacteriilor patogene. Totuşi căile de semnalizare directă între lactobacilli şi celulele secretorii nu au fost încă investigate. Ataşarea virusurilor determină eliberarea de către enterocite a prostaglandincitochinei şi oxidului nitric, influenţând peristaltismul

intestinal. Studiile au demostrat că există posibilitatea ca lactobacilii să poată influența acest fenomen.

O a patra ipoteză este legată de capacitatea lactobacililor de a inactiva particulele virale. Experimentele *in vitro* au demonstrat faptul că supernatantul culturilor de *L. rhamnosus* GR-1 și *L. fermentum* RC-14 inactivează 10^9 particule virale în 10 minute, efectul putând fi datorat în principal acidului lactic.

Este necesară însă verificarea acestor ipoteze în vederea stabilirii și înțelegerii mecanismelor implicate în efectul probiotic.

9.7.3. Gastroenteritele bacteriene

În afară de infecțiile cu rotavirusuri există însă o serie de infecții datorate microorganismelor patogene, care pot fi ameliorate prin tratament cu probiotice atât datorită efectului antimicrobian al acestora cât și prin competiția la nivelul situsurilor de aderență. Verificarea acestor efecte este mai greu de realizat la om *in vivo* dar există o serie de studii *in vivo* pe animale. Aceste studii au demonstrat acțiunea tulpinilor de *L. rhamnosus* GR-1, *L. fermentum* RC-14 sau *L. rhamnosus* GG in ceea ce privește stimularea secreției de sIgA și a fagocitozei, consecutiv cu scăderea numărului de celule de *Salmonella* de la nivelul tractului digestiv.

O problemă majoră legată de administrarea de antibiotice, în special clindamicină, cefalosporine și peniciline este instalarea diareei cauzate de *Clostridium difficile*. În condiții normale, *Cl. difficile* este o bacterie ce face parte din microbiota normală, dar dezechilibre la nivelul microbiotei intestinale postantibioterapie (tratamente de lungă durată sau repetate) pot determina dezvoltarea anormală a acestei bacterii anaerobe. Pentru tratarea acestor infecții, provocate de *Cl. difficile,* se utilizează tratament standard cu antibiotice și *Saccharomyces boulardii*. Studiile au evidențiat faptul că tratamentul combinat cu antibiotice și *L. rhamnosus GG* reduce rata de recurență a infecției cu *Cl. difficile* și îmbunătățește starea de sănătate a pacienților prin dispariția crampelor abdominale și a diareei.

Un test clinic realizat pe 180 de pacienți spitalizați, cărora li s-au administrat concomitent cu antibioticele *Saccharomyces boulardii* a redus rata îmbolnavirii de la 22% la 9,5%. În acest caz se presupune că mecanismul de acțiune ar consta în sinteza unei proteaze de 54 kDa care digeră toxinele A și B eliberate de *Cl. difficile*.

9.7.4. Infecția cu *Helicobacter pylori* și complicațiile acesteia

Helicobacter (H). pylori este o bacterie patogenă, Gram negativă responsabilă de apariția gastritelor B și a ulcerului peptic, reprezentând un factor de risc în cazul cancerului gastric. Există rezultate ale unor studii *in vitro* și *in vivo* care indică faptul că bacteriile lactice pot inhiba creșterea celulelor de *H. pylori* și

pot determina scăderea activității ureazei, enzimă necesară supraviețuirii bacteriilor în stomac. La om s-a constatat că probioticele scad riscul recurenței infecțiilor cu *H. pylori*. 120 de pacienți identificați ca fiind infectați cu *H. pylori* au participat la un studiu clinic, în care jumatate din pacienți au primit rabeprazol, claritromicină și amoxicilina, iar cealaltă jumatate același tratament plus un supliment de cultură liofilizată și inactivată de *L. acidophilus*. Eradicarea patogenului s-a realizat în proporție de 72% la pacienții tratați cu antibiotice și în proporție de 88% la cei cu tratament combinat. Mecansimul rămâne neclar mai ales că în acest caz celulele de bacterii lactice nu erau viabile. Posibile explicații ar fi inducerea unui răspuns al organismului gazdă și o excludere competitivă la nivelul situsurilor de aderență, respectiv al receptorilor glicolipidici ai mucoasei gastrice, mecanism dovedit în cazul eliminării celulelor de *E. coli* enterotoxigene (ETEC), de celule de lactobacili omorâte prin căldură (Chauviere et al., 1992). Într-un al doilea studiu pacienților le-a fost administrat înainte cu o saptămână și consecutiv cu tratamentul pe bază de claritomicină, lapte fermentat cu *L. jhonsonii* La1. Analizele de endoscopie, biopsie, histopatologie și testul ureazei au evidențiat scăderea densității celulelor de *H. pylori* și a activității gastrice și inflamatorii.

9.7.5. Cancerul

Capacitatea lactobacililor și bifidobacteriilor în modificările microbiotei intestinale și reducerea incidenței cancerului se datorează capacității acestora de a reduce nivelul de β-glucuronidază și de compuși carcinogeni. De exemplu, în cazul cancerului vezicii biliare instalarea la nivel intestinal a microorganismelor probiotice cum ar fi *L. casei* Shirota pare să reducă riscul apariției bolii. Studii *in vitro* cu *L. rhamnosus* GG + bifidobacterii și, respectiv *L. rhamnosus* GG+LC-705+ *Propionibacterium sp.* au demonstrat faptul că aceste microorganisme reduc concentrația de aflatoxină la nivelul lumenului. Un rol important în prevenirea cancerului îl pot avea si următorii factori: creșterea activității glutationtransferazei indusă de *B. longum*, lactuloză și amidon; creșterea activității NADPH-citocrom P450 reductazei și amplificarea capacității de a elimina O^6- metilguaninacorect O^6 de la nivelul mucoasei colonului. Fermentația anumitor compuși cum ar fi butiratul și lactatul sau scăderea tranzitului intestinal pot fi de asemenea importante în reducerea riscului apariției cancerului.

9.7.6. Imunitatea mucoasei

Experimentele cu *L. casei* Shirota injectat la șoareci au avut ca rezultat creșterea *activității killer* a celulelor din foliculii mezenterici, dar nu și a celor de la nivelul splinei. Studii similare realizate cu *L. rhamnosus* au confirmat rezultatele obținute anterior și susțin ipoteza conform căreia probioticele au rol de modulare a sistemului imunitar. Administrarea de probiotice șoarecilor a condus la creșterea activității leucocitelor și macrofagelor, creșterea fagocitozei și a răspunsului imun

al celulelor de la nivelul splinei. Un studiu clinic realizat cu pacienți cărora li s-a administrat *B. lactis* NH019 și *L. rhamnosus* HN001 a evidențiat o amplificare a parametrilor sistemului imunitar, dar nu s-a stabilit încă mecanismul prin care se realizează. Doza și durata terapiei cu probiotice sunt foarte importante în obținerea unui rezultat optim.

O altă direcție de studiu a microorganismelor probiotice este aceea de transportori de vaccin, cum este cazul tulpinii de *L. plantarum* NCIMB 8826 utilizată pentru transportul unui fragment C, imunogen, al toxinei tetanice.

9.7.7. Alergii

Compoziția microbiotei vaginale are efect în ceea ce privește condițiile de sănătate ale fătului, fapt demonstrat de un studiu danez realizat pe 2927 de femei și 3003 copii. S-a constatat că prezența la nivelul vaginului femeilor gravide a speciei *Ureaplasma urealyticum* a fost asociată cu un gâfâit la copiii nou-născuți, fără apariția astmului în primii 5 ani de viață. Colonizarea cu stafilococi și utilizarea antibioticelor în perioada sarcinii este asociată deseori cu apariția astmului la copii.

Administrarea de *L. rhamnosus* GG femeilor însărcinate timp de 4 săptămâni scade riscul apariției alergiilor la copiii nou-născuți, iar administrarea de *L. rhamnosus* GG și *B. lactis* BB-12 par să fie utile copiilor alergici la laptele de vacă. Datele existente până în prezent sugerează ipoteza conform căreia microorganismele probiotice inversează fenomenul de creștere a permeabilității intestinale, amplifică răspunsul imun (producerea de interleukină 10, factor de creștere β și citokine care stimuleaza producerea de anticorpi IgE) și determină reechilibrarea microbiotei intestinale. Rolul probioticelor în amplificarea factorului care stimulează diferențierea limfocitelor Th1 (T-*helper*) și în scăderea concentrației factorului Th2 rămâne să fie elucidat.

9.7.8. Aparatul reproducator și sănătatea vezicii urinare

Deși studiile realizate pe probiotice de uz urogenital se desfășoară de peste 20 de ani, abia recent au fost obținute date privind aplicabilitatea acestora nu numai în hrană. Administrarea orală și zilnică de 10^9 până la 10^{10} celule/doză de *L. rhamnosus* GR-1 și *L. fermentum* RC-14 conduce la transferul acestor bacterii din rect în vagin, ca și la îndepartarea coliformilor și drojdiilor din vagin. Testele realizate au arătat ca în timpul menstruației și în perioada postmenopauză microbiota vaginală este în general diferită față de condițiile normale. Valoarea Nugent este determinată prin analiza microscopică a celulelor vaginale și s-a demonstrat ca în cazul în care în microbiota vaginală predomină lactobacili acesta are o valoare scazuta între 0-3, în timp ce în cazul în care predominante sunt bacteriile Gram negative (*Gardnerella vaginalis* și *E. coli*) sau coci Gram pozitivi de tipul streptococilor sau enterococilor valoarea este mare, între 8 și 10. Valori

intermediare indică prezența patogenilor și lactobacililor într-o stare de tranziție. Infecțiile urinare, vaginitele bacteriene și cele determinate de drojdii afectează până la 2 miliarde de femei pe an. Conceptul de reechilibrare a conținutului în lactobacili al microbiotei vaginale în vederea prevenirii infecțiilor a fost propus pentru prima dată de urologul canadian Andrew Bruce în 1970 și de atunci studiile realizate au demonstrat că anumite tulpini de *Lactobacillus* au capacitatea de a coloniza vaginul și a reduce riscul infecțiilor la nivelul tractului urinar, al vaginitelor determinate de drojdii, ca și al vaginitelor bacteriene. Administrarea sub formă de supozitoare conținând 10^9 celule *L. rhamnosus* GR-1 și *L. fermentum* B-54 timp de un an la 25 de femei a condus la scăderea ratei de incidență a infecțiilor urinare de la 6 cazuri/an la 1,6/ an, fără a se înregistra nici un alt efect secundar, spre deosebire de tratamentul cu nitrofurantoin, caz în care 14% din pacienți au fost alergici la antibiotic și 40% au prezentat cel puțin un efect secundar.

În ceea ce privește prevenirea vaginitelor bacteriene studii recente au evidențiat faptul că ingerarea de capsule conținând *L. rhamnosus* GR-1 și *L. fermentum* RC-14 a condus la restabilirea microbiotei normale la 81% din cazuri comparativ cu 50% pentru grupul control. Trebuie verificată în cazul acestor boli și modalitatea de administrare: orală sau vaginală în vederea stabilirii unei eficiențe maxime a probioticului. Se știe deja că anumite tulpini de *Lactobacillus* printre care *L. crispatus* CTV05, *L. rhamnosus* GR-1 și *L. fermentum* RC-14 au capacitatea de a rămâne în vagin pentru câteva luni după localizarea la acest nivel.

Recent s-a constatat chiar că numărul redus de lactobacili de la nivelul tractului urogenital crește riscul apariției infecțiilor cu HIV, a gonoreei și trichomicozei. Mecanismul prin care acționează probioticele în prevenirea infecțiilor nu este încă elucidat, dar s-a constatat că supernatantul culturilor de *L. rhamnosus* GR-1 și *L. fermentum* RC-14 poate inactiva virusul HIV în câteva minute datorită acidifierii mediului. Este necesară investigarea mai amănunțită a mecanismelor implicate, dat fiind că administrarea orală sau vaginală de lactobacili este relativ ușoară și se poate realiza intensiv fără apariția unor efecte secundare.

O altă direcție de aplicare a probioticelor o reprezintă prevenirea riscului îmbolnăvirii la femeile gravide și implicit scăderea ratei mortalității la nou-născuți.

9.7.9. Probiotice utilizate în infecții chirurgicale

Într-o serie de studii *in vivo* pe animale s-a constat ca *L. fermentum* RC-14 și proteinele produse de organismul gazdă previn infecții severe cu *Staphylococcus (S) aureus* în cazul implanturilor chirurgicale. Deși în cazul oamenilor acest fenomen nu a fost încă investigat, totuși dat fiind creșterea numărului de tulpini de *S. aureus* rezistente la vancomicină și o serie de alte antibiotice, utilizarea probioticelor și a produșilor proteici derivați în tratamentul infecțiilor poate constitui o direcție viitoare de cercetare.

Aplicarea probioticelor la pacienții operați nu se limitează numai la piele și răni, de exemplu *L. plantarum* 299 a fost administrat unor pacienți cu transplant de ficat constatându-se o scădere a ratei de infecție postoperatorii. În cazul acestor

pacienți, datorită deficiențelor sistemului imunitar și malnutriției, riscul infecțiilor este foarte mare și poate conduce la complicații. Administararea de probiotice poate fi o alternativă eficientă la terapia cu antibiotice.

În toate aceste cazuri menționate mai sus se constată numeroase modalități de aplicabilitate a probioticelor în domeniul medical, dar sunt necesare studii suplimentare în vederea elucidării mecanismelor de acțiune a acestora.

Pentru probioticele de uz uman FAO recomandă în afară de testele *in vitro* și *in vivo* pe animale, cel puțin două teste clinice: primul care să fie realizat comparativ cu un grup control cărora li se administrează produse *placebo* și al doilea test - un studiu al produsului probiotic comparativ cu o terapie aplicată deja în cazul anumitor afecțiuni. Ambele studii clinice au ca scop demonstrarea eficienței utilizării probioticelor și efectele acestora.

9.8. METODE DE STUDIU *IN VITRO* ȘI *IN VIVO* AL EFICIENȚEI PROBIOTICELOR ȘI A UNOR SUBSTANȚE CU CARACTER PREBIOTIC

(Studii și modele experimentale realizate de un colectiv de cercetare din Fac. de Biologie, Universitatea din București)

Populațiile de microorganisme din sistemul digestiv și gazda lor formează un sistem ecologic al cărui echilibru este indispensabil pentru sănătatea individului. În acest sistem se realizează o serie de interacțiuni complexe, sinergice și antagonice, pe de o parte între diferitele populații de microorganisme, iar pe de altă parte, între acestea și gazda lor, care asigură echilibrul sistemului (starea de eubioză). Sistemul ecologic microbiotă/intestin poate fi perturbat prin administrarea unor substanțe antibiotice care distrug microorganismele sensibile creând disbioze și favorizând selectarea de tulpini antibiorezistente. Utilizarea antibioticelor ca promotori de creștere în concentrații subinhibitorii pe perioade lungi de timp a favorizat selecția de tulpini rezistente în microbiota normală a organismelor animale. Ratele crescute de rezistență la vancomicină a enterococilor de origine umană în Europa sunt consecința utilizării avoparcinei (antibiotic de natură glicopeptidică) ca promotor de creștere în fermele de pui și porci din Europa în anii '70. U.E. a interzis utilizarea avoparcinei ca promotor de creștere începând cu aprilie 1997. În Elveția, utilizarea antibioticelor ca promotori de creștere a fost interzisă încă din 1972. Studii recente au demonstrat ca tilozina (macrolid cu 16 atomi de C) utilizat de asemenea ca promotor de creștere, atât în Europa cât și in SUA acționează ca factor de selecție a enterococilor rezistenți la toate macrolidele. În Elveția, utilizarea tilozinei ca promotor de creștere a fost interzisă în 1999. Stoparea utilizării antibioticelor ca promotori de creștere a avut drept urmare scăderea rapidă a ratei de izolare a enterococilor rezistenți la vancomicină și

macrolide, dar şi la tetraciclină, ceea ce sugerează faptul că reducerea presiunii selective exercitate de aceste antibiotice poate avea efecte benefice şi asupra recuperării sensibilităţii la antibiotice cu structură chimică diferită de cea a celor utilizate ca aditivi în hrana animalelor (Blum et al., 1999; Collins et al., 1998). Rezultate similare sunt raportate şi în Danemarca, unde întreruperea utilizării virginiamicinei ca aditiv de creştere în 1997 a fost urmată de reducerea rezistenţei la acest antibiotic de la 66,2% în 1997 la 33% în 2000. Rezistenţa la antibiotice nu poate fi constrânsă de graniţe locale sau naţionale, de aceea confruntă întreaga lume. Incorecta utilizare poate genera un factor de mediu adiţional pentru selectarea şi menţinerea tulpinilor bacteriene rezistente. Acestea sunt diseminate foarte repede, purtate de oameni, animale şi produse alimentare de origine animală şi vegetală. Infecţiile umane cu bacterii rezistente la antibiotice fac tratamentul dificil prin limitarea spectrului de antibiotice utilizabile (Conway, 1996). Efectul dual al antibioticelor, atât benefic-antiinfecţios, cât şi negativ-de inducere a rezistenţei, ca şi uşurinţa cu care se pot răspândi tulpinile rezistente, trebuie să determine utilizarea raţională a acestor medicamente şi monitorizarea impactului lor asupra comunităţilor bacteriene, ca şi orientarea cercetărilor în direcţia găsirii unor noi alternative ecologice la metodele convenţionale de tratare a bolilor infecţioase umane şi animale şi mai ales pentru stimularea creşterii biomasei.

Microorganismele de tip probiotic reprezintă una dintre alternativele ecologice de tratare atât a infecţiilor gastrointestinale, cât şi a celor urogenitale. Conceptul de *"probiotic"* a fost introdus în 1965 (Lilly si Stillwell) desemnând substanţele produse de un protozoar (*Tetrahymena pyriformis*) care favorizează creşterea altui protozoar (*Stylonychia* sp.). În 1974 (Parker) defineşte ca probiotic orice supliment alimentar, care exercită un efect asupra gazdei, prin modificarea microbiotei intestinale. Definiţia acceptată în prezent este cea dată în 1989 de Fuller, conform căreia un probiotic este orice organism viu care adăugat alimentelor are efect benefic asupra organismului gazdă prin ameliorarea echilibrului microorganismelor din sistemul digestiv. Preparatele probiotice utilizează una sau mai multe tipuri de bacterii (*Lactobacillus (L.) bulgaricus, L. acidophilus, L. casei, L. helveticus, L. lactis, L. salivarius, L. plantarum, Bifidobacterium sp., Streptococcus termophilus*) care se adaugă în hrana animalelor de crescătorie sub diferite forme (granule, pudră, pastă, capsule, suspensii).

Caracteristicile unui bun probiotic sunt: lipsa de patogenitate şi toxicitate, capacitatea de a supravieţui în mediul intestinal şi de a exercita efecte benefice asupra organismului gazdei, accesibilitatea din punct de vedere economic, capacitatea de a rămâne stabil după tehnica de conservare (Matilla-Sandholm et al., 1999; Dunne et al., 2001).

Modul de acţiune al probioticelor nu este pe deplin elucidat, dar la ora actuală se consideră că probioticele exercită la nivelul mucoaselor atât un efect direct, antagonist, manifestat prin producerea unor metaboliţi de tipul acizilor organici, a H_2O_2 sau a unor substanţe macromoleculare cu acţiune antimicrobiană

(substanțe *bacteriocine – like,* antibiotice, biosurfactanți), competiție pentru nutrienți, blocarea colonizării bacteriilor patogene prin competiție pentru situsurile de aderență pe suprafața epiteliului intestinal, cât și unul indirect, manifestat prin modificarea metabolismului microbiotei intestinale, prin modularea activității unor enzime și stimularea imunității (prin creșterea activității macrofagelor și a concentrației de imunoglobulina A secretorie - sIgA) (Morelli, 2000).

Fenomenul de aderență microbiană la substratul celular sensibil reprezintă o precondiție *sine qua non* a proceselor de colonizare și infecție consecutivă; mecanismul are la bază competiția dintre microorganismele patogene cu cele autohtone pentru situsurile de aderență, fapt dovedit de numeroase observații microscopice care au evidențiat bacterii aderente la tegumente și mucoase.

Relativ recent a fost introdus și conceptul de *"prebiotic"* pentru a desemna componente alimentare nevii (de obicei oligozaharide) care nu pot fi degradate de către enzimele digestive ale mamiferelor în etajele superioare ale tractului intestinal. Ajunse în colon sunt hidrolizate de către anumite specii ale microbiotei colonului. Pentru a îmbunătăți funcționarea microbiotei intestinale și starea de sănătate a organismului gazdă, aceste substanțe ar trebui să fie direcționate spre populațiile de lactobacili și bifidobacterii, bacterii fermentative care produc acizi grași cu lanț scurt (AGLS) din carbohidrații prezenți în colon, cu efect de scădere a pH-ului la acest nivel. Acești metaboliți bacterieni (AGLS) sunt ușor absorbiți și utilizați ca sursă de energie de către mucoasa colonului, țesutul hepatic, muscular și cerebral. Atât pH-ul scăzut, cât și acești metaboliți, contribuie și la efectul de barieră exercitat de lactobacili și bifidobacterii. Substanțe cum ar fi inulina, fructooligozaharidele, lactuloza (galactofructoză – dizaharid nedigestibil), alfa-galactooligozaharidele, alfa-glucooligozaharidele, beta-glucooligozaharidele și mananooligozaharidele sunt cunoscute deja pentru efectul prebiotic (Reid, 1999).

Blocarea colonizării bacteriilor patogene prin competiție pentru situsurile de aderență pe suprafața epiteliului intestinal a fost dovedită atât experimental pe celule cultivate *in vitro* (figura 9.6), cât și de experimentele pe animale de laborator și de eficiența tratamentelor de prevenire a diareilor acute, care constau în introducerea în schema terapeutică recomandată de O.M.S (rehidratare și dietă) a unui preparat conținând celule de lactobacili omorâte aparținând tulpinii *L. acidophilus* (de origine umană). Perioada până la vindecare a fost mult mai scurtă, comparativ cu loturile de copii care au fost tratați cu un medicament de referință – loperamidă sau cu un produs *placebo.*

B. C. U. „M. EMINESCU" IAȘI CHIMIE

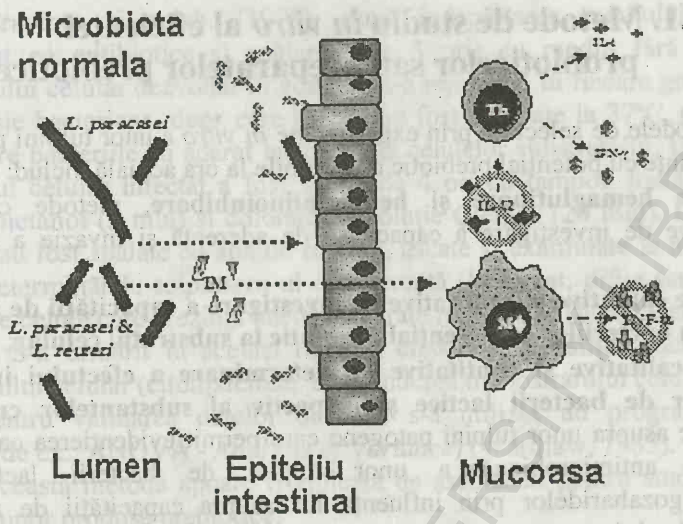


Figura 9.6. Mecanismul de acțiune propus pentru un produs probiotic reprezentat de tulpini probiotice de *Lactobacillus paracasei* si *reuteri* omorâtă prin căldură. Celulele aderente de probiotice determină o mascare sterică (1) şi/sau secretă compuşi activi, prevenind aderența patogenilor la receptorii celulari (1 şi 2) si invadarea celulelor învecinate (3). De asemenea probioticele interferă cu căile de semnalizare ale gazdei prin modificarea *pattern*-ului secreției de citokine

Există şi situații în care microorganisme care nu fac parte din ecosistemul tubului digestiv pe care îl tranzitează, exercită totuşi un efect antagonic (preventiv sau curativ); exemple:

- administrarea preventivă a speciei *Saccharomyces boulardii* reduce mortalitatea şobolanilor gnotoxenici inoculați oral cu *Clostridium difficile*, la care se observă scăderea producției de citotoxină, în timp ce numărul celulelor este puțin modificat;
- glucanul din peretele celular al levurilor (*Saccharomyces cerevisiae*) activează complementul şi fagocitele, având un efect protector în infecțiile bacteriene, fungice şi parazitare (efect imunomodulator);
- produşii de metabolism ai microorganismelor probiotice stimulează creşterea lactobacililor indigeni.

Aşadar, *screening*-ul unor tulpini bacteriene cu efecte potențial probiotice, pe baza capacității de aderență la substratul celular, ca şi studiul interacțiunilor dintre diferite bacterii lactice şi tulpini patogene în scopul evidențierii unor posibile efecte inhibitorii ale bacteriilor lactice asupra colonizării substratului celular utilizat, de către bacteriile patogene reprezintă o etapă importantă în selectarea unui bun probiotic (1-4).

9.8.1. Metode de studiu *in vitro* al eficienței probioticelor sau preparatelor prebiotice

Metodele de selectare prin experimente *in vitro* a unor tulpini probiotice și a unor substanțe cu potențial prebiotic disponibile la ora actuală includ:

- **teste de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare**, metode calitative și cantitative de investigare a capacității de aderență și invazie a substratului celular;
- **metodele calitative și cantitative de investigare a capacității de aderență și invazie a bacteriilor cu potențial probiotic la substratul celular;**
- **metode calitative și cantitative de determinare a efectului inhibitor al tulpinilor de bacterii lactice și respectiv al substanțelor cu potențial prebiotic** asupra unor tulpini patogene care permit evidențierea capacității de protecție antimicrobiană a unor tulpini de bacterii lactice și a mananoligozaharidelor prin influența lor asupra capacității de aderență la substratul celular a unor tulpini patogene.

Testele de hemaglutinare și hemaglutinoinhibare permit evaluarea efectului de blocare cu ajutorul preparatelor prebiotice (oligozaharide) a aderenței bacteriene, mediate de *adezine* sau structuri de aderență implicate în colonizarea substratului de către bacteriile patogene (ex. fimbriile de tip 1, manozosensibile, implicate în aderența enterobacteriilor oportuniste).

Metodele calitative și cantitative de investigare a capacității de aderență și invazie a bacteriilor cu potențial probiotic la substratul celular au la bază metoda Cravioto modificată (11-14).

Modelul utilizează ca substrat celular sensibil liniile celulare HEp-2 (*Human Epithelioma*), HeLa (linie tumorală de carcinom de col uterin-Helen Lane) sau CaCo-2 (linie de celule intestinale, de origine tumorală - Carcinom Colonic). Pentru cultivarea acestei ultime linii este necesară adăugarea la mediul pentru culturi celulare a unui supliment nutritiv numit **I.T.S.** –*(Insulin Transferrine Selenium)- Sigma,* care permite obținerea unui monostrat cu confluență 80% pentru realizarea testului de aderență în 48 de ore, aceste celule având în mod normal o creștere foarte lentă *in vitro* (fără adaosul nutritiv monostratul se realizează în 2 – 3 săptămâni). Celulele sunt cultivate în mediu Eagle MEM (EMEM) (Gibco), cu adaos de 10% ser fetal de vițel, glutamină 1%, soluție de antibiotice 1% (penicilină/streptomicină), soluție fungizon 1%, ITS 1%.

Testarea capacității de aderență (Ad.) și invazie (Inv.) se realizează în plăci pentru culturi celulare tip 24- *multiwell* (*Cel-Cult-U.K.*) (câte 2 plăci /experiment).

În varianta **calitativă** se studiază capacitatea bacteriilor lactice, respectiv a tulpinilor patogene de a adera la substratul celular, ca și *pattern*-ul de aderență (localizat, agregativ, difuz).

Varianta **cantitativă** permite aprecierea intensității proceselor de aderență și de invazie, prin stabilirea unor indici de aderență, respectiv de invazie.

În studii efectuate în țara noastră (Smarandache et al., 2004; Lazăr et al., 2004; Lazăr et al., 2005) a fost utilizat modelul experimental de bază reprezentat de

metoda Cravioto şi colab. (1979): după îndepărtarea mediului de creştere suplimentat cu antibiotice şi spălarea (de 3 ori) cu mediu fără antibiotice a monostratului celular dezvoltat în godeuri, s-a repartizat în fiecare godeu câte 1 ml de suspensie bacterian•, dup• care pl•cile au fost incubate la 37°C, timp de 2 ore, timp în care bacteriile au aderat la suprafaţa celulelor substratului. După incubare, monostratul celular infectat a fost spălat de 4 ori cu tampon fosfat salin (TFS), fixate cu metanol (5 min) şi colorate cu soluţie Giemsa (20 min). După colorare, godeurile au fost spălate cu apă de robinet, uscate şi examinate la microscopul cu imersie, determinându-se *pattern*-ul de aderenţă (localizat, difuz sau agregativ) şi numărul de celule care prezintă bacterii aderate raportat la 100 de elemente celulare numărate. S-a urmărit în acelaşi timp şi efectul suspensiilor bacteriene asupra monostratului celular (citotoxicitate, desprinderea monostratului celular etc).

Pentru validarea datelor obtinute s-a utilizat un program de analiză statistică (de ex., ANOVA - *Analysis of Variance*) (Wardlaw, 1985).

Această metodă apoate fi aplicată de asemenea pentru studiul *in vitro* al eficienţei unor produse prebiotice.

Rezultatele noastre privind testarea capacităţii de aderenţă la substratul celular (reprezentat de celule HeLa în cultură) a tulpinilor de bacterii lactice au demonstrat că tulpinile testate au prezentat *pattern*-uri şi rate de aderenţă diferite la substratul celular. Astfel, tulpinile de *Lactobacillus* testate au prezentat o capacitate de aderenţă foarte mare (indice de aderenţă (100%) şi un *pattern* de aderenţă agregativ sau un *pattern* mixt de aderenţă, agregativ şi localizat (Figurile 9.7, 9.8). Tulpinile aparţinând genului *Streptococcus* şi *Enterococcus* au prezentat rate de aderenţă mai reduse (indice de aderenţă 50%) şi un *pattern* de aderenţă difuz (Figura 9.9).

Figura 9.7. Celule HeLa infectate cu lactobacili (*L. acidophilus GM14*) cu *pattern* de aderenţă agregativ (colorație Giemsa, x2500)

Figura 9.8. Celule HeLa infectate cu lactobacili (*L. acidophilus GM8*) cu *pattern* de aderență mixt agregativ și localizat (indicat de săgeată) (colorație Giemsa, x2500)

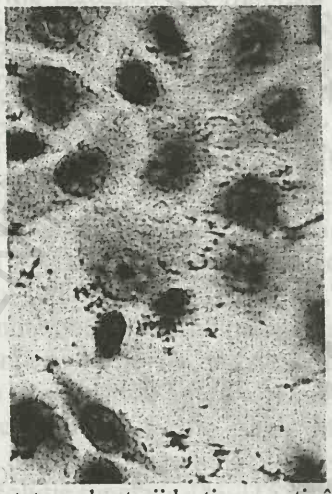


Figura 9.9. Celule HeLa infectate cu bacterii lactice aparținând genului *Enterococcus* VL-43 cu *pattern* de aderență difuz (colorație Giemsa, x2500)

De menționat că în general morfologia de tip bacilar a fost asociată cu un *pattern* de aderență agregativ sau localizat, în timp ce tipul morfologic sferic a fost asociat predominant cu un *pattern* de aderență difuz.

S-a observat că bacteriile lactice induc desprinderea monostratului celular, probabil datorită acumulării produșilor cu caracter acid (acid lactic sau acizi grași cu lanț scurt de atomi de carbon). De aceea, pentru investigarea capacității de aderență a bacteriilor lactice se recomandă utilizarea unui monostrat celular

confluent, şi nu a unuia semiconfluent (50-80%), cum se recomandă în general pentru studiile de aderenţă bacteriană la substratul celular.

Intensitatea aderenţei lactobacililor se poate testa atât pentru culturi integrale aflate în faza semilogaritmică de creştere, cât şi pentru sedimente de celule spălate cu TFS. Paradoxal, intensitatea aderenţei bacteriilor lactice din sedimentul celular s-a dovedit a fi mult mai scăzută comparativ cu cea a bacteriilor din cultura integrală utilizată, ceea ce înseamnă pe de o parte că intensitatea aderenţei este dependentă de gradientul anumitor substanţe secretate şi acumulate în mediul de cultură şi implicate direct sau indirect în semnalizarea intercelulară şi transmiterea de semnale care favorizează aderenţa, şi că structurile bacteriene implicate în aderenţa la substratul celular (*adezinele*) pot fi îndepărtate în timpul centrifugării, pe de altă parte.

Experimentele de *screening* al capacităţii de aderenţă permit selectarea unor tulpini de bacterii lactice, care pot fi studiate în continuare pentru influenţa acestora asupra capacităţii de aderenţă la substratul celular a unor tulpini patogene.

Metodele calitative şi cantitative de determinare a efectului inhibitor al tulpinilor de bacterii lactice si respectiv al substanţelor cu potential prebiotic sunt utilizate pentru determinarea interacţiunilor dintre bacterii potenţial probiotice (*Bifidobacterium bifidum*, *L. acidophilus* şi *L. casei*) sau diferite preparate prebiotice (ex. galactomanan, extract de perete celular de drojdii) şi tulpini ale unor specii de enterobacterii patogene sau condiţionat-patogene selectate pentru capacitatea de aderenţă.

În aceste studii se utilizează tulpini de enterobacterii patogene şi condiţionat-patogene testate (din colecţie şi tulpini proaspete, izolate de la animale monogastrice), sub formă de culturi de 24 ore în bulion nutritiv din care se prepară suspensii bacteriene în tampon fosfat salin (TFS), cu densitate optică D.O. = 2 (măsurată spectrofotometric la λ = 600 nm), care corespunde densităţii celulare de 1 x 10^9 U.F.C./ml. Suspensiile de lucru cu densitatea celulară de 1 x 10^7 U.F.C./ml, se obţin prin diluare 1/100 în mediu Eagle MEM (*Eagle Minimal Essential Medium*) fără adaos de soluţii de antibiotice. Tulpinile bacteriene condiţionat patogene utilizate în aceste studii au fost reprezentate de *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Salmonella gallinarum*, izolate din cazuri de boala diareică.

Studiul influenţei tulpinilor de bacterii lactice asupra capacităţii de aderenţă la substratul celular a unor tulpini bacteriene patogene a demonstrat că tulpinile de bacterii lactice selectate au prezentat efecte inhibitorii asupra aderenţei tulpinilor patogene la substratul celular, manifestate prin diminuarea accentuată a indicelui de aderenţă (până la 0 în cele mai multe cazuri) sau prin formarea de agregate mixte, între patogeni şi lactobacili, care au aderat la substratul inert dar nu şi la substratul celular (aspect ce ar putea fi explicat prin faptul că aderarea celulelor între ele are drept consecinţă blocarea situsurilor de aderenţă la substratul celular) (Lazăr et al., 2004). Inhibarea aderenţei patogenilor se datorează şi unui fenomen de competiţie pentru situsurile de aderare existente la nivelul celulelor

epiteliale, datorită faptului că absenţa patogenilor a fost corelată cu prezenţa lactobacililor aderaţi atât la substratul celular, cât şi la substratul inert.

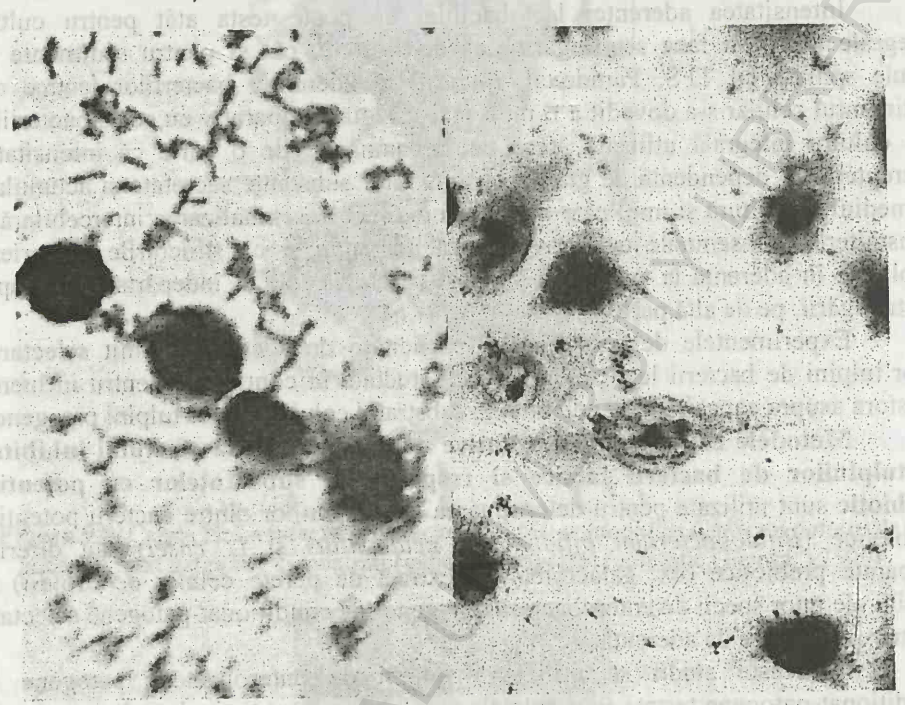


Figura 9.10. Aspectul celulelor HeLa infectate cu *Escherichia coli* (celule contractate) cu bacterii aderate localizat (stg.) şi respectiv al celulelor HeLa infectate cu *Escherichia coli* însă în prezenţa culturii de *L. acidophillus* GM8 (dr.); se observă reducerea aderenţei celulelor de *Escherichia coli* si reducerea efectului citopatic (de contractare a celulelor eucariote)

Studiul efectului inhibitor al tulpinilor de probiotice asupra capacităţii de aderenţă şi invazie a tulpinilor bacteriene patogene poate fi realizat comparativ cu culturi integrale de lactobacili, cât şi cu suspensii de bacterii lactice obţinute din sedimente spalate cu TFS. S-a observat că bacteriile lactice spălate nu reuşesc să inhibe aderenţa tulpinilor patogene la fel de intens ca şi cultura integrală, ceea ce dovedeşte odată în plus faptul că efectul inhibitor al lactobacililor nu se datorează exclusiv competiţiei celulelor de lactobacili cu bacteriile patogene pentru situsurile de aderenţă de la nivelul celulelor epiteliale, ci şi metaboliţilor solubili secretaţi şi acumulaţi în mediul de cultură. Dintre aceştia se pot enumera acidul lactic şi alţi acizi graşi cu lanţ scurt de atomi de C –AGLS- care determină scăderea pH-ului ce poate inhiba creşterea bacteriilor asociate, cât si alţi factori antibacterieni, cum ar fi peroxidul de hidrogen, substanţe bacteriocin-*like*, enzime litice şi posibil biosurfactanti etc) (Lazăr et al., 2004).

Această ipoteză este susţinută şi de rezultatele acţiunii celulelor de lactobacili centrifugate şi spălate cu TFS, care nu au manifestat un efect inhibitor la fel de intens ca cel exercitat de celulele aflate în mediul de cultură şi de efectul

inhibitor al filtratelor sterile ale culturilor de lactobacili care, indiferent de tulpina de patogen cercetată au inhibat capacitatea de aderență la substratul celular, iar microscopic s-a putut evidenția distrugerea integrității celulelor bacteriene cu absența formelor morfologice tipice și cu prezența de resturi celulare (Lazăr et al., 2004).

În ceea ce privește aspectul celulelor eucariote la microscop în prezența bacteriilor patogene și a filtratelor sterile de cultură de lactobacili, acestea prezintă o membrană lobată, fapt ce poate dovedi o capacitate mare de endocitoză, ca și cum resturile bacteriene ar fi recepționate ca simple surse nutritive de către celulele eucariote, fiind preluate printr-un proces similar celui de endocitare a corpilor apoptotici de către celulele eucariote învecinate dintr-un țesut. Așadar, scăderea indicilor de aderență a tulpinilor de patogeni în prezența filtratelor sterile de culturi de lactobacili ar fi mai degrabă rezultatul scăderii numărului de celule viabile capabile să adere la substratul celular, și nu în mod obligatoriu al blocării situsurilor specifice de aderență de pe suprafața celulelor eucariote, respectiv a celulelor bacteriene (Lazăr et al., 2004).

La efectul microbicid al condițiilor fizico-chimice induse de prezența lactobacililor se adaugă efectul inhibitor indirect prin alterarea morfologiei celulare datorită producerii de acizi grași cu lanț scurt de atomi de carbon.

Studiul efectului inhibitor al unor fracții glucidice extrase prin diferite metode din perete celular de *Hansenula polymorpha*, a demonstrat că acestea au efecte variabile asupra capacității de aderență și invazie a tulpinilor patogene pe culturi celulare, de inhibare sau de ușoară stimulare a capacității de aderență a tulpinilor de patogeni. Acest efect moderat de stimulare a capacității de aderență a tulpinilor de patogeni ar putea avea doua explicații posibile:

1. fracțiunile oligozaharidice și mananooligozaharidice conținute în aceste fracții ar putea constitui surse nutritive suplimentare pentru bacteriile care se multiplică mai intens, numărul de bacterii viabile fiind direct proporțional cu indicele de aderență al respectivelor celule.
2. Fracțiunile existente funcționează ca liganzi intermediari între adezinele bacteriene și receptorii de adezine de pe suprafața celulelor epiteliale, intensificând astfel capacitatea de aderență a acestora la substratul celular.

De menționat că în prezența fracțiilor cu efect inhibitor asupra aderenței bacteriilor patogene, morfologia celulelor eucariote nu a fost afectată, ceea ce sugerează faptul că eliberarea de către celulele bacteriene a unor factori citotoxici sau citopatogeni care determină contractarea celulelor eucariote și alterarea membranei plasmatice ar fi consecutivă aderenței la substratul celular (figura 9.11).

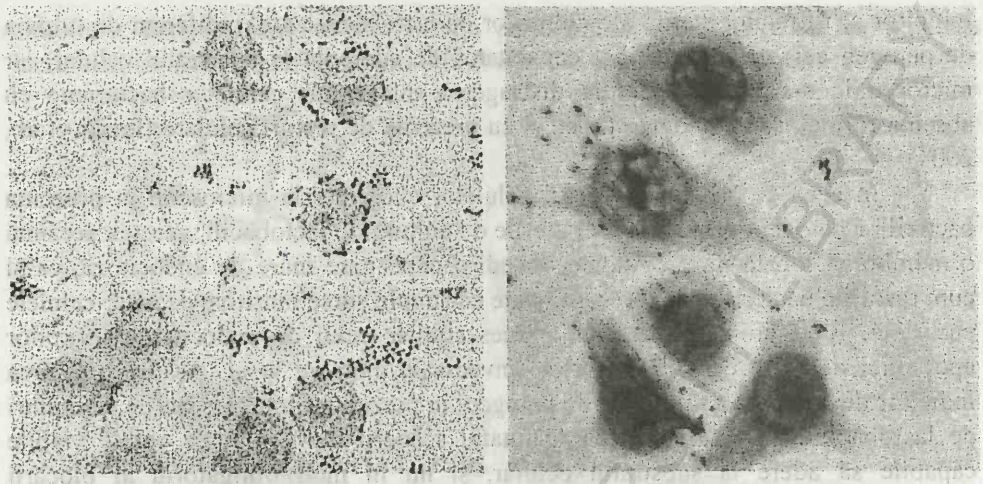


Figura 9.11. Aspectul celulelor HeLa infectate cu *Staphylococcus aureus* (celule picnozate) cu bacterii aderate difuz şi localizat (stg.) şi respectiv al celulelor HeLa infectate cu *Staphylococcus aureus* însă în prezenţa fracţiilor mananoligozaharidice.

Aşadar studiul *in vitro* al eficienţei probioticelor sau preparatelor prebiotice a demonstrat faptul ca tulpinile de bacterii lactice inhibă aderenţa unor tulpini de bacterii patogene la substratul celular, ca şi secreţia de factori cu acţiune citotoxică. Această inhibiţie competitivă apare prin ocuparea situsurilor de legare şi prin secreţia unor factori solubili care afectează fie capacitatea de aderenţă la substratul celular, fie viabilitatea celulelor bacteriene. Aceste rezultate demonstrează importanţa acestei etape de studiu al capacităţii de aderenţă a bacteriilor lactice în selectarea unor tulpini cu potenţial probiotic (Lazăr et al., 2004).

Cu toate acestea, trebuie să ţinem cont că aderenţa bacteriană este un fenomen dependent de o serie de condiţii fizico-chimice care nu pot fi reproduse în totalitate în modelele experimentale *in vitro* care utilizează culturile de celule; astfel, valoarea predictivă a rezultatelor obţinute *in vitro* utilizând modelul culturilor celulare, pentru efectul probiotic manifestat *in vivo* este limitată (Lazăr et al., 2005).

9.8.2. Metode de studiu *in vivo* al eficienţei probioticelor sau preparatelor prebiotice

Aceste modele permit demonstrarea eficienţei *in vivo* a unor produse probiotice şi prebiotice selectate pentru efectele antimicrobiene şi pentru competiţia pentru situsuri de aderenţă prin experimente *in vitro* pe culturi de celule epiteliale, la care efectul benefic al produselor probiotice/prebiotice testate este urmărit prin evidenţierea interacţiunilor cu microorganisme patogene.

ETAPELE REALIZĂRII MODELULUI EXPERIMENTAL

1. Caracterizarea calitativă şi cantitativă (UFC/ml) a microbiotei normale intestinale eliminate în materiile fecale la modelul animal utilizat (şobolani holoxenici, convenţionali).

Înainte de demararea experimentului propriu-zis, animalele sunt caracterizate din punct de vedere al compoziţiei microbiotei intestinale. Astfel, s-a observat ca **microbiota normală intestinală eliminată în materiile fecale** la aceste animale este constituită în exclusivitate din bacterii lactozo-fermentative (Lazăr et al., 2005). Tehnica diluţiilor zecimale a permis de asemenea evaluarea cantitativă a acestor bacterii lactozo-fermentative, a căror densitate prezintă o valoare medie de $3x10^5$ UFC/ml.

Caracterizarea biochimică a coloniilor dezvoltate pe mediul McConkey a evidenţiat faptul că aceste bacterii lactozo-fermentative sunt catalazo-negative, oxidazo-negative, se dezvoltă pe medii cu concentraţii crescute de săruri biliare (40%) şi de esculină, tolerează concentraţii crescute de sare (se dezvoltă în medii cu [NaCl] de 6,5%) şi cresc la 42°C. Aceste caracteristici biochimice particulare au confirmat apartenenţa acestor bacterii la genul *Enterococcus* (sau grupul streptococilor de grup Lancefield D). Identificarea biochimică a fost confirmată prin diagnostic serologic, prin aglutinarea cu serul monovalent anti-D din schema de serogrupare Lancefield, care se bazează pe identificarea unor fracţiuni antigenice de natură polizaharidică din constituţia peretelui celular.

Cultivarea materiilor fecale pe mediu MRS a evidenţiat faptul ca lactobacilii constituie componenta predominantă numeric la aceste animale, fiind eliminaţi în număr foarte mare (~$4x10^8$UFC/ml).

Deoarece în materiile fecale ale acestor animale nu se elimină bacterii lactozo-negative, mediul McConkey a putut fi utilizat în continuare pentru izolarea bacteriilor patogene lactozo-nefermentative cu care s-a realizat infecţia.

2. Caracterizarea microbiologică calitativă şi cantitativă a microbiotei normale intestinale care colonizează diferite segmente ale tractului intestinal la animalele utilizate în modelul experimental

După sacrificarea animalelor (prin cloroformizare), au fost prelevate fragmente de intestin din duoden, ileon şi colon, care au fost cântărite şi spălate în TFS, pentru îndepărtarea conţinutului luminal şi a microorganismelor neaderate. Ulterior, secţiunile de intestin au fost fragmentate şi mojarate steril, după care au fost realizate diluţii zecimale în AFS (apa fiziologică sterilă), care au fost însămânţate pe mediu lactozat (mediu McConkey) şi pe mediu pentru evidenţierea lactobacililor (mediu MRS).

Analiza rezultatelor a demonstrat că diferitele regiuni ale tractului intestinal conţin bacterii lactozo-negative aderente la mucoasă, chiar dacă acestea nu sunt eliminate în materiile fecale. Acestea au fost găsite în special în colon (~10^3UFC/g), în număr mult mai mic însă în comparaţie cu microbiota lactozo-fermentativă care colonizează atât ileonul (~$7x10^2$UFC/ml), cât şi colonul (~$5x10^4$UFC/g) (Lazăr et al., 2005).

Cultivarea secțiunilor de intestin pe mediu MRS, a relevat faptul că lactobacilii colonizează în număr mare atât duodenul ($7x10^6$UFC/g), cât și colonul ($6x10^7$UFC/g), însă sunt absenți în ileon (Lazăr et al., 2005).

3. Selectarea microorganismului patogen utilizat pentru realizarea infecției experimentale

Tulpina de infecție a fost reprezentată de *Salmonella enteritidis*, agent al gastroenteritelor și toxiinfecțiilor alimentare atât la om, cât și la diferite specii de animale, inclusiv păsări. Acești agenți patogeni au fost evidențiați într-o mare varietate de alimente, dar mai ales în carne și produsele din carne de pasăre, pentru că diferitele serotipuri de *Salmonella* infectează în special găinile și curcanii, iar infecția la om se produce în urma ingerării de produse contaminate.

4. Descrierea modelului de patogeneză experimentală pe șobolani holoxenici

Realizarea modelului experimental a presupus utilizarea a 6 loturi de câte 5 animale, care au fost tratate după cum urmează:

- un lot martor sau control la care s-a administrat cu aceeași frecvență ca și la celelalte loturi, tampon fosfat salin (TFS);
- câte un lot martor pentru fiecare produs testat, la care s-a administrat produsul respectiv, o dată/ zi (o doză de 20 ml /lot cu o densitate $>10^9$ UFC/ml);
- un lot la care s-a realizat infecția cu *Salmonella enteritidis* (20 ml suspensie cu densitate $>10^{10}$ UFC/ml/lot);
- un lot la care concomitent cu infecția, s–a administrat și produsul testat (în aceeași doză ca la lotul de control);
- un lot la care infecția s-a realizat la 3 zile de la administrarea zilnică a produsului testat;
- un lot la care produsul testat a fost administrat ulterior infecției (la 24 de ore).

Parametrii urmăriți la animalele studiate au fost:

- greutatea;
- analiza microbiologică calitatitivă și cantitativă a materiilor fecale pe toată durata experimetului;
- analiza microbiologică calitativă și cantitativă a conținutului intestinal din diferite segmente ale tubului digestiv (duoden, ileon, colon).

Rezultatele obținute au permis evidențierea unor aspecte importante privind dinamica microbiotei intestinale autohtone si alohtone în cursul procesului infecțios și influența probioticelor asupra acestui proces.

În ceea ce privește lotul martor de infecție, s-a observat că eliminarea patogenului în materiile fecale după infecție s-a realizat cu o rată de ~50% din doza de infecție ($\sim10^4$ - 10^5UFC/g). Eliminarea patogenilor a fost însoțită și de o creștere a ratei de eliminare a bacteriilor lactice.

Ratele de eliminare a patogenilor, ca și a lactobacililor s-au menținut constante timp de 3 zile, până la sacrificarea animalelelor.

La sacrificarea animalelor şi recoltarea fragmentelor de tract intestinal s-a observat că tulpina de *Salmonella* utilizată colonizează cu rate similare duodenul şi ileonul ($4x10^2$UFC/g conţinut intestinal), şi cu rate mai crescute colonul ($4x10^4$UFC/g).

Spre deosebire de lotul martor, s-a observat o redistribuire a populaţiei de bacterii lactice, care colonizează în număr mare (>10^6 UFC/g) toate cele 3 segmente analizate (duoden, ileon, colon). Aşadar, aceste rezultate ar putea sugera că în urma pătrunderii unui agent infecţios alohton în tubul digestiv, are loc creşterea bruscă a densităţii microbiotei normale şi distribuirea omogenă a acesteia pe toată lungimea tractului digestiv, pentru a asigura blocarea situsurilor de colonizare. Se poate observa de asemenea o creştere a densităţii microorganismelor lactozo-pozitive în regiunile proximale ale tractului intestinal, care în mod normal sunt mai puţin colonizate cu microorganisme datorită prezenţei unor factori limitanţi ai multiplicării bacteriilor în intestinul subţire reprezentaţi de: aciditatea gastrică, peristaltismul intestinal care asigură tranzitul relativ rapid spre intestinul gros şi existenţa unor substanţe care inhibă creşterea microorganismelor (Lazăr et al., 2005).

La lotul de control pentru produsul probiotic, administrarea preparatului probiotic produce o modificare cantitativă în populaţia de bacterii lactice eliminate (de la 10^8 UFC/g materii fecale la lotul control negativ la 10^{10}UFC/g la martorul cu produs probiotic). In schimb, la 24 de ore de la administrarea produsului probiotic, rata de eliminare a bacteriilor lactozo-fermentative a scăzut semnificativ, probabil datorită modificării constantelor fizico-chimice ale habitatului intestinal sub acţiunea lactobacililor administraţi, care determină reducerea viabilităţii microorganismelor alohtone. Această ipoteză este susţinută şi de rezultatele obţinute după sacrificarea animalelor şi analiza cantitativă a microbiotei care colonizează diferite segmente ale tubului digestiv, care au arătat că microbiota lactozo-pozitivă este absentă în duoden şi ileon, fiind prezentă doar în colon, însă cu o densitate mai scazută decât la lotul control negativ ($6x10^3$UFC/g conţinut intestinal). În schimb, toate segmentele tractului intestinal analizate au fost colonizate cu bacterii lactice în densitati similare cu grupul control negativ (14).

În ceea ce priveşte lotul de animale la care infecţia experimentală s-a realizat concomitent cu începerea administrării produsului probiotic (care a fost continuată timp de 3 zile) s-a observat ca lactobacilii administraţi favorizează eliminarea mai rapidă a celulelor de *Salmonella,* concomitent cu reducerea densităţii microbiotei normale eliminate, care probabil aderă la situsurile intestinale, pentru a bloca aderarea patogenilor; acest rezultat este susţinut şi de rezultatele analizei cantitative a colonizării microbiene a diferitelor segmente ale tractului intestinal, care au demonstrat creşterea densităţii microbiotei lactozo-pozitive, mai ales la nivelul colonului.

La lotul de animale la care preparatul cu lactobacili a fost administrat timp de 3 zile înainte de infecţia experimentală, aşadar în scop « profilactic », a avut loc o scădere generală semnificativă a densităţii microbiotei lactozo-pozitive şi a bacteriilor lactozo-negative (bacterii cu care s-a realizat infecţia) eliminate în

materiile fecale, cu conservarea densității bacteriilor lactice eliminate. Aceste rezultate confirmă faptul că lactobacilii administrați exercită un "efect de epurare' asupra microbiotei normale ca și alohtone prezente la un moment dat în tractul digestiv, probabil prin mecansime nespecifice reprezentate de acumularea de produși de metabolism care afectează condițiile fizico-chimice locale (ex. scăderea pH-ului prin acumulare de acid lactic).

Analiza compoziției microbiene a diferitelor segmente ale tubului digestiv a confirmat aceste rezultate, indicând diminuarea densității microbiotei lactozo-pozitive și lactozo-negative în toate segmentele analizate, cu conservarea unei densități crescute de bacterii lactice pe tot traseul tractului intestinal, aceste bacterii fiind rezistente în noile condiții fizico-chimice generate.

La lotul de animale la care preparatele de lactobacili au fost administrate timp de 3 zile, după realizarea infecției experimentale, așadar, în "scop terapeutic, curativ", s-a observat că produsul probiotic are același efect, ca și în cazul administrării concomitente, și anume, determină eliminarea bacteriilor lactozo-negative cu care s-a realizat infecția, acestea fiind absente din tubul digestiv, așa cum arată rezultatele analizei microbiologice a diferitelor segmente. Lactobacilii se cantonează în acest caz în special la nivelul colonului, unde s-a observat o creștere a densității bacteriilor lactice, față de lotul martor control negativ și lotul la care s-a administrat soluție de probiotic (Lazăr et al., 2005).

Administrarea unui produs cu potențial prebiotic pe bază de mannanoligozaharide în dieta animalelor a condus la o creștere a numărului de lactobacili (10^{10} UFC/g) comparativ cu cei din lotul de control cu o dieta normală (10^5 UFC/g). In cazul în care prebioticul este administrat concomitent cu infecția, celulele de *Salmonella enteritidis* sunt eliminate în dejecții într-o proporție mai mare (10^7) decât se elimină în cazul lotului de animale infectat cu *Salmonella* (10^5 UFC/g), fără a afecta rata de eliminare în fecale a microbiotei normale.

În urma administrării produsului prebiotic salmonelele nu mai aderă la epiteliul intestinal, acestea fiind eliminate în proporții semnificative în materiile fecale.

În timp ce la animalele din lotul martor infectat cu *Salmonella enteritidis*, bacteria patogenă este prezentă în număr mare pe toată lungimea tractului digestiv (10^5 UFC/g), la toate animalele infectate și tratate concomitent cu prebiotic pe baza de mananoligozaharide, *Salmonella* a fost absentă în toate segmentele analizate. In schimb, administrarea produsului pe bază de mannanoligozaharide a determinat creșterea numărului de lactobacili în segmentele proximale ale tubului digestiv.

9.8.3. Studiul siguranței administrării probioticelor din punct de vedere al riscului de transmitere a unor gene de rezistență la antibiotice

Una dintre principalele preocupări privind siguranța administrării probioticelor este riscul transmiterii de gene de patogenitate, virulență sau rezistență la antibiotice, microorganismelor autohtone sau patogene din tractul

intestinal (Ahrne et al., 1996). Cele mai controversate specii de probiotice din acest punct de vedere sunt enterococii, datorită implicării frecvente a genului *Enterococcus* în etiologia infecţiilor nosocomiale şi rezistenţei crescute la antibiotice (Franz et al., 1999).

In cazul speciei *Enterococcus faecium* este de reţinut rezistenţa naturală (intrinsecă/constitutivă) de nivel scăzut la o serie de clase de antibiotice:

- aminoglicozide (gentamicină) datorită secreţiei de enzime inactivatoare ale antibioticului;
- la antibioticele betalactamice din categoria penicilinelor (piperacilina, amoxicilina şi oxacilina) şi cefalosporinelor (cefotaxim), prin modificarea afinităţii ţintei (fie ca rezultat al unor mutaţii cromozomale care reduc sinteza şi/sau afinitatea proteinelor preexistente care leagă antibioticele beta-lactamice (PLP), fie al achiziţiei unei gene care exprimă o nouă PLP, cu afinitate redusă pentru betalactami);
- la macrolide, *E. faecium* prezentând frecvent fenotipul MLSb (*Macrolide Lincosamide Streptogramine B*) constitutiv (care conferă rezistenţă la eritromicină, lincomicină, pristinamicină) prin protejarea (metilarea) ţintei ribozomale.

De asemenea, *E. faecium* prezintă rezistenţă de nivel ridicat la glicopeptide prin modificarea ţintei antibioticelor (operonul *van*A) (Smarandache et al., 2004). Creşterea ratelor de rezistenţă la vancomicină a enterococilor reprezintă la ora actuală o problemă majoră de sănătate publică atât în Europa, cât şi SUA, unde rata infecţiilor cu enterococi rezistenţi la vancomicină a crescut de la 0,3% în 1989 la 13% în 1996, cu demonstrarea transmiterii clonale a tulpinilor rezistente. Dacă în SUA originea acestor tulpini este controversată, în Europa s-a demonstrat că ratele crescute de rezistenţă la vancomicină a enterococilor de origine umană (2-28%) sunt consecinţa utilizării intensive în anii ' 70 a avoparcinei (antibiotic de natură glicopeptidică) ca promotor de creştere în fermele de pui şi porci.

S-a semnalat că la *E. faecium* operonul *van* A are localizare plasmidială, iar respectiva plasmidă R codifică, de asemenea, un feromon de sex sintetizat de *S. aureus*, aspect ce poate facilita transferul conjugativ al operonului *van* A de la enterococii rezistenţi la stafilococi, ceea ce explică emergenţa tulpinilor de stafilococi rezistenţi la vancomicină, printr-un mecanism similar celui prezent la speciile de *E. faecium* (Smarandache et al., 2004). Experimentele de conjugare au arătat că rata de transfer între donorii *vanA* şi celulele *vanA*-negative receptoare variază de la 2×10^{-7} până la $>2 \times 10^{-4}$.

Rezistenţa dobândită la cloramfenicol este predominant plasmidială la enterococi şi se datorează prezenţei unor gene *cat* (*cloramphenicole acetylating enzyme*) omoloage cu genele *cat* de origine stafilococică. Prezenţa acestei gene conferă tulpinii gazdă fenotip Cmr-Emr (rezistenţă la cloramfeniol şi eritromicină). Plasmida conjugativă pIP501 (30,2 kb), cu spectru larg de gazdă, a fost izolată pentru prima dată din tulpina B96 de *S. agalactiae*, fiind probabil transmisă, prin transfer orizontal, enterococilor şi stafilcocilor.

Screening-ul rezistenței la antibiotice poate fi așadar util pentru detectarea multirezistenței codificate de elemente genice mobile (ex. plasmide transpozabile) care pot fi transmise prin transfer orizontal atât bacteriilor condiționat-patogene din microbiota normală, cât și speciilor patogene prezente în momentul administrării antibioticului în tractul intestinal.

Drept urmare, în Raportul Grupului de Lucru pentru Elaborarea unui Ghid de Evaluare a Administrarii Probioticelor în Hrană (*FAO/WHO Working Group*) (2002) se recomandă caracterizarea *pattern*-ului de antibiorezistență la toate speciile de microroganisme utilizate ca probiotice, incluzind chiar și speciile General Recunoscute ca Sigure (GRAS).

În Romania, studiile de selectare a unor microorganisme cu potențial probiotic au urmărit investigarea *pattern*-urilor de antibiorezistență la tulpini de *E. faecium* și de lactobacili prin metoda disc difuzimetrică standardizată după recomandările NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*).

S-a demonstrat astfel că tulpinile de *E. faecium* prezintă rezistență naturală de nivel scăzut la aminoglicozide (gentamicină, tobramicină), ca și rezistență la cefalosporine (de generația a II-a, cefuroxim și de generația a III-a, ceftriaxonă) (Smarandache et al., 2004).

Tulpinile studiate au fost sensibile la glicopeptide (vancomicină și teicoplanină), așadar utilizarea acestora ca probiotice nu prezintă riscul de diseminare a genelor de rezistență la glicopeptide la tulpinile izolate din clinică, comensale sau izolate din mediul ambiant (Smarandache et al., 2004).

Screening-ul antibiorezistenței la tulpinile de lactobacili a demonstrat prezența multirezistenței la antibioticele betalactamice, inclusiv la cefalosporinele de generația a III-a, ca și la aminoglicozide și vancomicină.

Experimentele efectuate de colectivul de cercetare din Facultatea de Biologie, Universitatea din București, a condus la următoarele concluzii:

1. In cursul infecției experimentale cu administrarea unei doze crescute de microorganisme patogene (> doza minimă infețioasă), are loc o redistribuire a microbiotei normale, care "avansează" spre regiunile proximale ale tubului digestiv, în scopul blocării situsurilor de aderență și colonizare prezente la acest nivel.
2. Administrarea de cultură de lactobacili determină eliminarea salmonelelor în materiile fecale, în proporție semnificativă, cu reducerea concomitentă a eliminării microbiotei normale, care, în absența agentului patogen, aderă și colonizează mai intens tractul intestinal, pe toată lungimea acestuia, blocând astfel aderarea patogenilor și inițierea procesului infecțios cu poartă de intrare digestivă. Acest efect se manifestă atât în cursul administrării profilactice (doze repetate), concomitente (în doză unică) sau terapeutice (doze repetate, postinfecție), ceea ce permite selectarea unor metode variate de administrare a acestor produse ca probiotice.

3. În ceea ce priveşte influenţa lactobacililor administraţi în preparate probiotice asupra compoziţiei microbiotei lactice autohtone, s-a observat că administrarea lactobacililor determină o creştere a densităţii bacteriilor lactice, atât a celor care aderă şi colonizează diferite segmente ale tubului digestiv, ca şi a celor luminale, eliminate în materiile fecale.
4. *Screening*-ul rezistenţei la antibiotice a microorganismelor ce urmează a fi utilizate ca probiotice este util şi necesar pentru detectarea multirezistenţei codificate de elemente genice mobile (ex. plasmide transpozabile) care pot fi transmise prin transfer orizontal speciilor patogene sau microbiotei autohtone din tractul intestinal.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10. PRODUSE BIOTEHNOLOGICE UTILIZATE ÎN NUTRIȚIA ANIMALELOR

10.1. INOCULANȚI PENTRU SILOZ

10.1.1. Însilozarea şi dificultățile sale

Procesul de însilozare poate fi asimilat cu un sistem cu trei componente: *vegetal – enzime – bacterii*, în care fiecare element joacă un rol specific (Bertin şi Hellings, 1985):

1. ***Substratul vegetal*** conține *glucide parietale*: celuloză, hemiceluloză, pectine, etc. şi *glucide de rezervă*: amidon şi în special fructozani (tabelul 10.1).

Raportul acestora depinde de specia plantei, condițiile de cultură şi de momentul recoltării.

Tabelul 10.1.

Conținutul în glucide de rezervă a gramineelor şi leguminoaselor [de Roissart, 1994]

Glucide	*Graminee (%)*	*Lucernă (%)*
Glucoză	0,1-4,6	0,1-3,1
Fructoză	0,1-2,4	0,1-3,6
Zaharoză	1-12,2	0,01-6,9
Fructozani	0,1-20,9	-
Amidon	-	0,2-11,2

2. ***Enzimele*** vegetale, bacteriene sau fungice conținute de conservantul biologic constituie un arsenal enzimatic glucidic care poate depolimeriza peretele vegetal eliberând în masa furajului glucide solubile [Dale, 1985]. Aceste glucide cu grad variabil de polimerizare, de la monomere la polimere, vor putea fi utilizate de către bacteriile lactice capabile să le metabolizeze.

3. ***Bacteriile epifite*** - (existente pe plantă) se dezvoltă în masa furajului în cursul procesului de însilozare, metabolizând glucidele solubile și producând, în cazul bacteriilor lactice, acid lactic, un conservant natural al silozului.

Aceste trei elemente joacă un rol primordial în reușita sau eșecul însilozării.

10.1.2. Condițiile unei însilozări reușite

Pentru ca un siloz să fie de bună calitate, trebuie ca produsul vegetal să conțină destule glucide fermentescibile, adică peste 12- 13 % din masa uscată (cazul general al gramineelor la prima tăiere de primăvară) [Bolsen, 2000] și destule bacterii lactice care să fermenteze glucidele, adică cel puțin 10^5 celule / gram de plantă verde. Aceste condiții nu sunt întotdeauna îndeplinite în practică.

Cantitatea de glucide necesare reușitei însilozării depinde nu numai de conținutul plantei în materie uscată și de puterea sa tampon (conținutul în proteine, în acizi organici și cationi), ci și de factorii care favorizează eliberarea rapidă a sucurilor celulare (frăgezimea plantei, finețea tocării, presiunea de tasare, temperatură) [Martin, 1998]. Prin urmare, noțiunea de *zahăr solubil* este insuficientă pentru a caracteriza pretabilitatea la însilozare a unei plante. Din tabelul 10.2. se poate observa că pH – ul necesar stabilității însilozării depinde de *conținutul în substanță uscată* a plantei însilozate. Pretabilitatea la însilozare depinde de asemenea de raportul dintre conținutul în glucide solubile / puterea de tamponare a produsului vegetal. Astfel, la un conținut egal în glucide fermentescibile, o graminee se însilozează mai bine decât o leguminoasă pentru că puterea tampon a leguminoaselor este cu mult mai mare (figura 10.1).

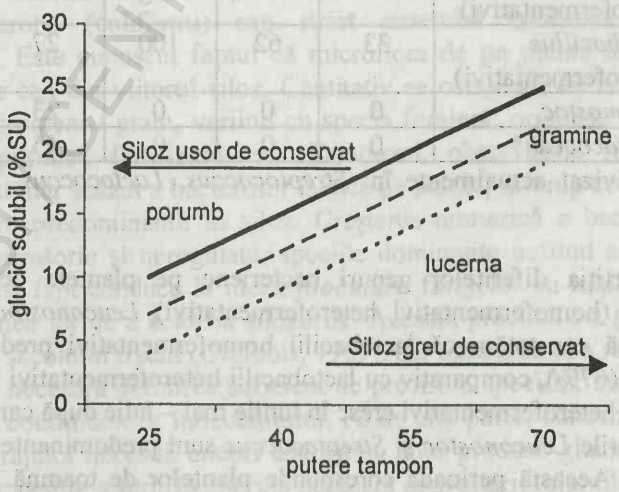


Figura 10.1. Pretabilitatea la însilozare a furajelor verzi în funcție de puterea lor tampon

Tabelul 10.2

Variația pH- ului în funcție de conținutul în substanță uscată a furajului

S.U. (%)	pH
15-20	4
20-25	4-4,2
25-30	4,2-4,4
30-35	4,4-4,6
35-40	4,6-4,8

10.1.3. Bacteriile lactice si procesul de insilozare; evoluția sezonieră a bacteriilor lactice epifite

Studiile realizate pe plante furajere, ale căror rezultate sunt prezentate în tabelul 10.3., arată că, deși numărul de bacterii lactice prezente pe ierburi crește din luna mai și până în octombrie, numărul de genuri bacteriene este mic în lunile aprilie – iunie (două genuri), scade în iulie (un gen) și crește mult până în octombrie (patru genuri).

Tabelul 10.3

Evoluția sezonieră a bacteriilor lactice epifite

Bacterii lactice		Aprilie Mai	Mai Iunie	Iunie Iulie	August	Septembrie Octombrie
Număr (log_{10})		1,42	2,24	2,25	3,31	4,22
Număr de genuri		2	2	1	4	4
Genuri (%)	*Lactobacillus* (homofermentativi)	67	38	0	5	12
	Lactobacillus (heterofermentativi)	33	62	100	27	36
	Leuconostoc	0	0	0	23	28
	*Streptococcus**	0	0	0	45	24

(*)Gen subdivizat actualmente în: *Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus și Vagococcus*

Repartiția diferitelor genuri bacteriene pe plantele de primăvară ca: *Lactobacillus* (homofermentativi, heterofermentativi), *Leuconostoc, Streptococcus,* ne permite să constatăm că lactobacilii homofermentativi predomină în lunile aprilie – mai (67%), comparativ cu lactobacilii heterofermentativi (33%). Numărul lactobacililor heterofermentativi cresc în lunile mai – iulie după care descresc.

Genurile *Leuconostoc* și *Streptococcus* sunt predominante în lunile august – octombrie. Această perioadă corespunde plantelor de toamnă. Astfel se poate explica de ce gramineele de primăvară, la prima coasă, cu un număr mare de bacterii lactice homofermentative, pot fi însilozate fără conservanți cu mari șanse de reușită, spre deosebire de plantele de toamnă. Acest echilibru natural bacterian

este precar şi riscă să fie modificat de un mare număr de factori: dispunerea geografică, varietatea vegetală, tehnicile de cultură, fertilizarea, precipitațiile în momentul cosirii, variabilitatea microflorei epifite şi condițiile climatice (temperatura, umiditatea, radiațiile, etc.). Ca urmare, se recomandă *folosirea unui conservant* care va creşte şansele de reuşită a însilozării plantelor furajere.

10.1.4. Utilizarea de adaosuri pentru însilozare

Există trei grupe de adaosuri pentru însilozare:

1) Adaosuri care vin cu un aport de *substanțe energetice asimilabile* (melasă, zer, zaharoză şi alte glucide fermentescibile). În acest caz glucidele sunt transformate în acid lactic cu un randament ridicat. Pentru a obține un siloz în carea valoarea pH-ului să fie 4, trebuie să se producă aproximativ 2% acid lactic într-un furaj slab tamponat (graminee) sau chiar dublu într-un furaj cu putere tampon ridicată (leguminoase).

2) Adaosuri care vin cu aport de bacterii lactice viabile (inoculanți pentru siloz). Numărul de bacterii necesare însilozării este de cel puțin 10^5 cel / gram plantă verde. Nu trebuie, însă, luat în considerare doar numărul de bacterii lactice la începutul însilozării. La fel de importante sunt performanțele tulpinilor şi conținutul şi solubilitatea sursei de energie.

3) Adaosuri care vin cu un aport de bacterii lactice viabile asociate cu un complex enzimatic eficace (amilaze, hemicelulaze, celulaze, etc). **sau cu un suport energetic fermentescibil.** Acest tip de adaosuri intră tot în grupa inoculanților pentru siloz.

Acidifierea rapidă la pH 4 rămâne cea mai bună şi mai sigură metodă de inhibare a proteolizei vegetale şi a dezvoltării unei microflore dăunătoare, facultativ anaerobă (coliformi) sau strict anaerobă sporulată (*Clostridium tyrobutyricum).* Este cunoscut faptul că microflora de pe planta în picioare este total diferită de cea din viitorul siloz. Cantitativ ea oscilează de la câteva sute la câteva mii de germeni / gram, variind cu specia furajeră, organele plantei, sezon, pluviometrie, păşunat, fertilizare, etc. Paradoxal, observațiile relevă prezența aleatorie şi în număr scăzut a bacteriilor lactice pe plante, în timp ce ele vor deveni după câteva ore predominante în siloz. Creşterea numerică a bacteriilor lactice rămâne totuşi aleatorie şi neregulată, speciile dominante nefiind adeseori şi cele dizerabile. Acest fapt conduce la ideea ***inoculării*** furajelor cu tulpini selecționate pentru aptitudinea lor de a acidifia silozurile. Această practică s-a preconizat încă de la începutul secolului trecut (Crolbois, 1909), dar aplicarea ei a rămas mult timp empirică, fiind necesară definirea suficient de precisă a speciilor mai performante, concentrația şi condiționarea inoculantului. Pe de altă parte, concentrația variabilă în glucide a furajelor necesită uneori adăugarea unor produse glucidice, în special la leguminoase, pentru a furniza energia necesară dezvoltării tulpinilor acidifiante.

Eficacitatea unui ***inoculant*** (conservant biologic) depinde de asemenea de tulpinile alese şi mediile nutritive cu care ele sunt însoțite. Speciile de bacterii lactice utilizate în industria laptelui nu dau rezultate la însilozare, deoarece ele nu

sunt capabile să domine microflora autohtonă. Tulpinile care vor fi utilizate la obținerea unui inoculant (conservant) trebuie să fie izolate de pe același tip de substrat cu cel care urmează a fi însilozat. Dintre speciile capabile să se adapteze acestui biotip enumerăm: *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus paracasei, Pediococcus acidilactici, Pediococcus pentosaceus, Enterococcus faecium,* ș.a., toate fiind specii homolactice, puternic acidifiante și capabile să se dezvolte rapid între 15°C și 35°C utilizând glucidele solubile din furaje (glucoză, zaharoză, maltoză, celobioză, etc.) și cele venite ca adaosuri energetice: melasă (zaharoză), zer (lactoză), diverse reziduuri (tăiței epuizați de sfeclă de zahăr) și alte subproduse ale industriei alimentare.

Mediul nutritiv din inoculant, când este prezent, trebuie să permită bacteriilor lactice să-și reia rapid creșterea în furaj. Pentru aceasta el trebuie să conțină factori de creștere, microelemente, asociate cu nutrienți azotați (aminoacizi și peptide) și energetici (glucide direct asimilabile).

Dacă furajul este sărac în glucide solubile, inoculantul (conservantul biologic) trebuie complectat cu un aport energetic sau cu enzime exogene capabile să fracționeze poliglucidele parietale ale celulelor vegetale din furaj.

În fine, condițiile de aplicare ale inoculantului, în special repartizarea lui omogenă în masa furajului, tasarea și asigurarea anaerobiozei, conținutul în substanță uscată a furajului, sunt factori importanți care determină reușita însilozării.

10.1.5. Enzime folosite în procesul de însilozare

Preparatele enzimatice folosite la însilozare sunt extracte enzimatice brute din culturi bacteriene sau fungice. Aceste preparate se deosebesc între ele atât prin originea lor microbiană (tabelul 10.4.), cât și prin natura și domeniul lor de activitate.

Tabelul 10.4

Surse de complexe celulozolitice de origine fungică

Trichoderma viride – Mandels et all. (1974)
Trichoderma koningii – Halliwel și Griffin (1973), Wood și Mc Crae (1968)
Chrysosporium lignorum – Erikson și Petterson (1975)
Stachybotrys atra - Wood (1968 și 1969)
Gliocladium roseum – Wood (1968)
Aspergillus niger - Wood (1968)
Aspergillus oryzae - Wood (1968)
Rhizopus – Selby și Maitland (1965)
Fusarium solani – Wood (1969)
Fusarium javanicum - Wood (1969)
Penicillium funiculosum – Selby și Maitland (1965)

Enzimele celulozolitice de origine bacteriană au un nivel de activitate prea slab pentru a fi compatibile cu exigențele însilozării, de aceea, în acest scop, se folosesc complexe celulozolitice de origine fungică.

Mii de organisme au abilitatea de a crește pe medii de celuloză. Deși multe dintre acestea cresc destul de rapid, doar puține produc celulaze extracelulare capabile să producă "in vitro" conversia celulozei în glucoză.

Celuloza (substratul natural al celulazelor) constituie componenta de bază a pereților celulari vegetali. Se găsește adesea în plante sub formă de fibre. Fibra de celuloză este constituită din diferite straturi succesive ale căror proprietăți fizico-chimice și mecanice conferă fibrei funcționalitatea sa specifică.

Din punct de vedere chimic, fibra vegetală este alcătuită din trei constituenți principali: celuloza, hemicelulozele și ligninele.

Celuloza este un poliglucid insolubil, liniar, din a cărui hidroliză rezultă molecule de celobioză, dizaharid alcătuit din două molecule de glucoză legate după tipul 1,4β-D glucopiranoză.

În țesuturile vegetale, celuloza nu se găsește în stare liberă, ea fiind legată de alți constituenți: lignina, pectinele, hemiceluloza, cu care formează complexe greu hidrolizabile. De cele mai multe ori, celulozoliza este precedată și favorizată de procesele de pectinoliză, în urma cărora legăturile dintre fibrele de celuloză se desfac, astfel încât ajung să fie expuse pe toată suprafața lor la acțiunea microflorei celulozolitice.

Degradarea biologică a celulozei a fost evidențiată pentru prima dată de Omelianski, care a studiat evoluția acestui proces în condiții de anaerobioză. Ulterior, Winogradsky a stabilit marea importanță a celulozei în natură [55].

Hemicelulozele, sunt heteropoliglucide cu un grad de polimerizare mai mic și sunt mai ușor hidrolizabile decât celuloza. Constituenții principali sunt xiloza, arabinoza și glucoza. Sunt prezente în cantități mari în paie, în proporție de 6-30% din compoziția țesuturilor vegetale.

Ligninele, sunt polimeri tridimensionali de origine fenolică și intră în alcătuirea pereților celulari ai țesuturilor lemnoase. Formată în cursul dezvoltării plantei prin procesul de "lignificare" al celulozei din peretele celular, ea reprezintă până la 30% din greutatea uscată a organismului vegetal.

Celuloza, hemicelulozele și ligninele în stare naturală pe de o parte, sunt insolubile în apă, iar pe de altă parte nu sunt direct accesibile enzimelor celulozolitice datorită structurii cristaline și a diferitelor tipuri de legături care leagă cei trei polimeri (forțe Van der Waals, punți de hidrogen, legături covalente).

Un substrat atât de complex cum întâlnim în cazul biomasei lignocelulozice nu poate fi hidrolizat total de o singură enzimă. Sistemul enzimatic produs de tulpinile de *Trichoderma viride* și *Aspergillus niger* este un amestec de diferite enzime ce cooperează între ele [Jurcoane, Vintilă, 1999]. Rezultatele cercetărilor efectuate au arătat că există două sisteme enzimatice principale:

- unul specific hemicelulozelor,
- altul specific celulozei.

Mecanismul de acțiune al enzimelor care hidrolizează hemicelulozele este asemănător cu cel al celulozelor, dar specificitatea lor de substrat este net superioară ultimelor.

Sistemul enzimatic care hidrolizează celuloza este compus din trei clase de enzime:

- **exoglucanazele**, care atacă molecula de celuloză la capătul nereducător al lanțului, eliberând resturi de celobioză; ele sunt denumite celobiohidrolaze;
- **endoglucanazele**, care operează aleatoriu în interiorul lanțului de celuloză, creând astfel situsuri de atac suplimentare pentru exoglucanaze;
- **celobiazele** (β-glucozidazele), care hidrolizează celobioza, dar în același timp și celotrioza și celotetroza cu formare de glucoză.

Cercetările efectuate în acest domeniu au arătat faptul că cele mai active complexe enzimatice pe substrat vegetal sunt acelea care au activitate hemicelulozolitică mai puternică, ducând la apariția pentozelor (xiloze și arabinoze).

Este bine cunoscut faptul că, gradul de polimerizare al hemicelulozelor și de încrustare cu lignină, are efect asupra digestibilității celulozei vegetale de către animale.

Studiile de secvențializare a celulazelor de origine fungică cu ajutorul tehnicilor cromatografice și electroforetice, au arătat că sunt necesare două clase de enzime pentru a asigura hidroliza celulozei native și că prezența unei a treia clase de enzime (β-glucozidaza) accentuează procesul de fermentație. Cele două clase sunt:

- Clasa de enzime C_x, *CM-celulaza*, celodextrinază, care este în principal o endo β 1-4 glucanază;
- Clasa de enzime C_1 sau *β 1-4 D glucan, celobiohidrolază.*

În mod individual, fiecare dintre ele are o slabă activitate asupra celulozei cristaline. Împreună însă ele acționează sinergic, rezultând o activitate celulozolitică mult mai bună.

Reese și colab. (1950) au formulat o ipoteză asupra mecanismului de hidroliză enzimatică al celulozei. Potrivit acesteia – componentul C_i care inițiază celulozoliza este o enzimă nonhidrolitică, care separă lanțurile de celuloză prin ruperea punților de hidrogen, având ca efect dezorganizarea celulozei. Ei considerau această etapă ca o condiție prealabilă pentru acțiunea enzimelor hidrolitice C_x (figura 10.2.).

Experiențele lui Wood (1969) infirmă, însă această primă ipoteză. Teoriile actuale susțin că C_1 este o endoglucanază și probabil, o celobiază. S-a sugerat astfel (figura 10.3.) că solubilitatea regiunilor cristaline depinde de formarea complexelor C_1 și Cx pe suprafața celulozei cristaline.

Se pare, deci, că acțiunea celulozolitică implică mai întâi atacul secvențial, unde *endoglucanazele* (C_x) acționează la întâmplare. Ele încep atacul și produc noi extremități de lanțuri care sunt hidrolizate instantaneu de către exoglucanaze (C_1) pentru a evita refacerea legăturilor glucozidice.

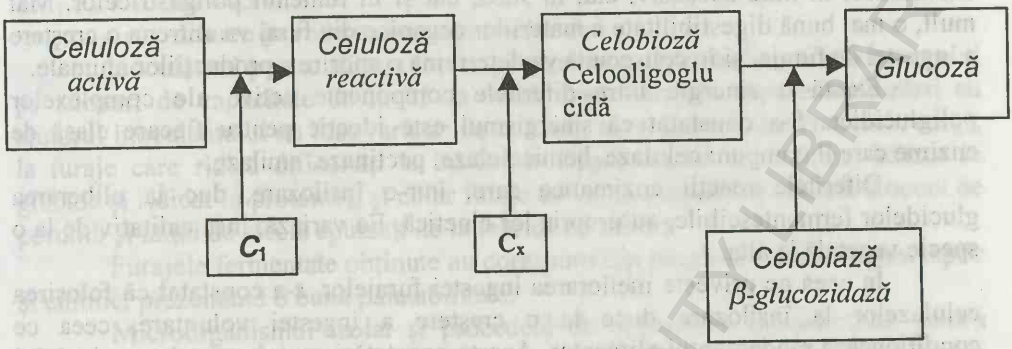


Figura 10.2. Prima ipoteză a lui Reese, conform căreia C_1 este o enzimă nonhidrolitică

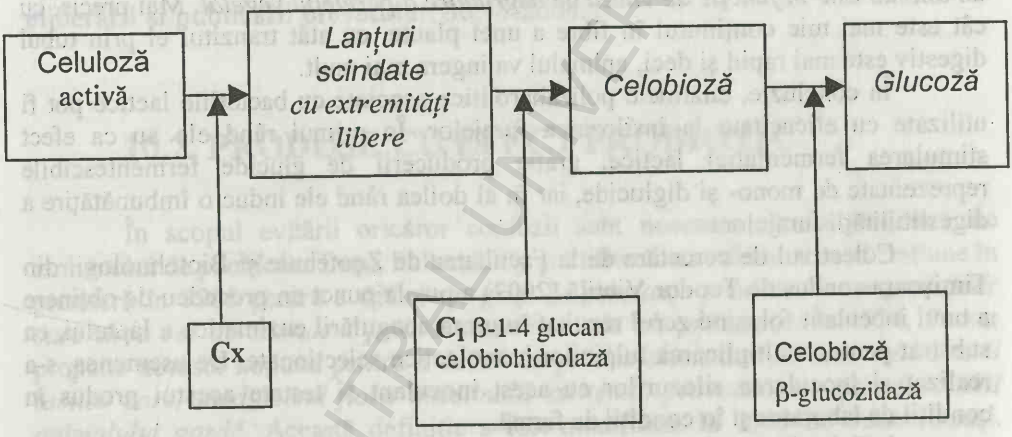


Figura 10.3. Teoria lui Wood, conform căreia C_1 este o endoglucanază

10.1.6. Efectele complexului enzimatic celulozoitic asupra furajului

Complexele enzimatice utilizate în fermentarea silozului, degradează constituenții peretelui celulelor vegetale prin multiple atacuri asupra poliglucidelor de către mai multe enzime care acționează sinergic. Degradarea constituenților parietali ai celulelor vegetale poate avea două efecte succesive:

a) unul de **conservare** – care constă într-o ameliorare a fermentației furajelor de către bacteriile lactice și

b) altul **valorificator** – care constă într-o mai bună digestie a furajului de către animale.

Este bine cunoscut faptul că digerarea celulozei de către animale depinde de gradul de polimerizare a hemicelulozelor și de încrustarea lor cu lignină. Se poate, deci, considera că degradarea enzimatică a hemicelulozelor va crește

digestibilitatea furajelor făcând mai accesibilă celuloza parietală atacurilor enzimatice, în mod succesiv, atât în siloz, cât şi în rumenul poligastricelor. Mai mult, o mai bună digestibilitate a materiilor organice din furaj va antrena o creştere a ingestei de furaje, şi în consecinţă va determina o sporire a producţiilor animale.

Există o sinergie între diferitele componente active ale complexelor poliglucidice. S-a constatat că sinergismul este identic pentru fiecare clasă de enzime care îl compun: celulaze, hemicelulaze, pectinaze, amilaze.

Diferitele reacţii enzimatice care, într-o însilozare, duc la eliberarea glucidelor fermentescibile, au propria lor cinetică. Ea variază, însă calitativ de la o specie vegetală la alta.

În ceea ce priveşte meliorarea ingestei furajelor, s-a constatat că folosirea celulazelor la însilozare duce la o creştere a ingestei voluntare, ceea ce condiţionează randamentul alimentar. Aceste constatări sunt de acord cu principiul propus de Crampton şi Maynard, conform cărora *cantitatea de alimente ingerate de un animal este în funcţie de viteza de degradare a peretelui vegetal.* Mai precis, cu cât este mai mic conţinutul în fibre a unei plante, cu atât tranzitul ei prin tubul digestiv este mai rapid şi deci, animalul va ingera mai mult.

În concluzie, enzimele polizaharolitice asociate cu bacteriile lactice pot fi utilizate cu eficacitate la însilozarea furajelor. În primul rând ele au ca efect stimularea fermentaţiei lactice, graţie producerii de glucide fermentescibile reprezentate de mono- şi diglucide, iar în al doilea rând ele induc o îmbunătăţire a digestibilităţii furajelor.

Colectivul de cercetare de la Facultatea de Zootehnie şi Biotehnologii din Timişoara condus de Teodor Vintilă (2002) a pus la punct un procedeu de obţinere a unui inoculant folosind zerul rezultat în urma coagulării enzimatice a laptelui, ca substrat pentru multiplicarea tulpinilor homolactice selecţionate. De asemenea, s-a realizat şi inocularea silozurilor cu acest inoculant şi testate acestui produs în condiţii de laborator şi în condiţii de fermă.

1. Tulpinile producătoare au următoarele caracteristici:

- o acumulare rapidă de biomasă de celule vii (sfârşitul fazei logaritmice după 8 ore de dezvoltare);
- temperatură optimă de multiplicare la 42°C, ceea ce protejează cultura de contaminare în condiţii de producţie;
- capacitatea de a acumula biomasă pe medii industriale simple, ieftine şi accesibile, fapt care prezintă avantaje economice şi oferă posibilitatea de aplicare a produsului în prepararea de furaje fermentate.

2. Din punct de vedere tehnologic, procedeul este simplu şi implică următoarele etape:

a) conserv vegetativ de bacterii lactice pe MRS cu carbonat de calciu;
b) subcultură pe mediu de laborator MRS lichid (inocul I)
c) cultură în laborator în recipiente de capacitate mare, pe mediu MRS lichid inoculat în proporţie de 1% (inocul II);
d) biosinteză pe mediu ieftin şi accesibil (de exemplu zer, sau cereale măcinate şi umectate cu soluţii conţinând glucoză tehnică, melase,

etc.), inoculat în proporție de 5%, în condiții septice, și incubare la 40 – 45°C;

e) diluare în vederea inoculării silozului.

Inoculantul pentru siloz a fost experimentat pe microsilozuri în laborator și pe silozuri de capacitate de la 15 la 1000 tone. Furajele supuse însilozării cu ajutorul inoculantului au fost variate: de la furaje ușor de însilozat (porumb, sorg), la furaje care ridică dificultăți la însilozare (leguminoase cu conținut scăzut în glucide și ridicat în proteine), și chiar furaje cu valoare nutritivă scăzută (coceni de porumb și tăiței de sfeclă epuizați de la fabrica de zahăr).

Furajele fermentate obținute au corespuns din punct de vedere organoleptic și chimic, prezentând o bună palatabilitate.

Microorganismul izolat și procedeul de obținere a inoculantului pentru siloz a fost propus și acceptat pentru brevetare la **OSIM. Brevet de invenție nr. 119062 B1** cu titlul: Procedeu de obținere a unui furaj fermentat. Data eliberării și publicării brevetului: 30.11.2004.

10.2. PRODUSE CU EFECT PROBIOTIC

În scopul evitării oricăror confuzii sunt necesare câteva precizări ale termenului de ***probiotic.*** După Fuller, Lilly și Stillwell au utilizat această noțiune în premieră în 1965 pentru a defini *un grup de substanțe produse de un protozoar care avea rol de stimulent pentru creșterea unui alt protozoar.* În 1974, Parker propune această noțiune pentru a defini *un produs alimentar pe bază de bacterii lactice care, modificând flora intestinală existentă, provoacă un efect favorabil animalului gazdă.* Această definiție a fost modificată în 1989 de Fuller însuși. Conform acestui autor, noțiunea de probiotic desemnează *un supliment alimentar bazat pe unul sau mai multe tipuri de microorganisme viabile care au un efect benefic asupra animalului gazdă, grație obținerii unui mai bun echilibru a florei intestinale.* Important este faptul că toți autorii subliniază *caracterul viabil* al microorganismelor utilizate și *efectul lor benefic asupra animalului care le consumă.*

În concepția actuală, analizând produsele comerciale existente pe piață, produse de companii comerciale cu renume în domeniu, se poate lărgi conceptul de probiotic și pentru produse obținute din părți sau extracte de culturi microbiene. În categoria produselor cu efect probiotic sunt incluse mananoligozaharidele din peretele celular al drojdiilor [Parks, 2000], extracte celulare de la drojdii, extracte din medii de cultivare ale bacteriilor și fungilor producători de enzime celulozolitice sau proteolitice [Rostagno, 2000], proteină microbiană în amestec cu microelemente chelatate organic, toate acestea folosite ca atare sau în amestec cu microorganisme procariote și eucariote viabile [Sanders, 1999].

Recent, la cel de-al IX- lea Congres Internațional de Culturi care a avut loc la Brisbane, Australia, între 23-28 iulie, 2000, s-a emis o definiție reactualizată,

conform căreia **probioticele** sunt *preparate din celule microbiene sau componente din celule microbiene care au efect benefic asupra sănătății gazdei* sau *preparate microbiene vii care consumate ameliorează sau vindecă bolile, acționând prin modificarea florei gastro-intestinale, prin schimbarea metabolismului și interacția cu microorganismele prezente în intestin.*

10.2.1. Compoziția si rolul florei intestinale

Ecosistemul microbian digestiv este constituit din bacterii aparținând unor numeroase grupe taxonomice capabile de a se dezvolta în anaerobioză. Cunningham distinge, printre speciile identificate, 3 categorii:

- O floră dominantă strict anaerobă sau microaerofilă (peste 90%) (*Bifidobacterium, Lactobacillus,* etc);
- O floră subdominantă facultativ anaerobă (sub 1%) (*E. coli, Enterococcus,* etc);
- O floră reziduală sau fluctuantă (sub 0,01%) (*Clostridium, Proteus, Staphylococcus, Pseudomonas, Candida* și bacterii cu potențial patogen).

Flora dominantă reprezintă 10^7 - 10^{11} celule/gram conținut intestinal [Klaenhammer 1998, Tjandraatmadja, 1990]. Activitățile enzimatice ale acestei flore variază în funcție de specia animalului gazdă.

Flora intestinală se poate găsi la diferite nivele ale lumenului intestinal și anume:

- Bacterii care traversează lumenul intestinal și sunt excretate fără a se putea multiplica deoarece durata tranzitului digestiv este inferioară timpului lor de multiplicare;
- Bacterii care se găsesc pe suprafața sau în mucusul intestinal, făcând parte din flora intestinală activă;
- Bacterii care aderă la suprafața epiteliului intestinal și fac parte de asemenea din flora activă.

Flora intestinală intervine la nivel anatomic, nutrițional și metabolic, dar are și rol protector împotriva infecțiilor bacteriene. În acest caz sunt posibile mai multe moduri de acțiune printre care: *efectul de barieră* (rezistență la colonizare) și *creșterea numărului de plasmocite* secretoare de IgA.

După Sanders (2002), efectul benefic al unei flore este în funcție de starea ei de echilibru. Însă, condițiile de creștere a animalelor și reacțiile lor senzoriale specifice nu permit întotdeauna această stare de echilibru.

10.2.2. Variațiile florei intestinale

Există o serie de factori endogeni și exogeni care intervin în ecosistemul digestiv și sunt responsabili de interacțiunile complexe între flora autohtonă și alte microorganisme:

VARIAȚII DETERMINATE DE BACTERII SAPROFITE

În condiții fiziologice normale, bacteriile aparținând grupelor dominante și subdominante pot să dispară și să fie înlocuite de alte bacterii aparținând în general aceluiași gen. După administrarea unui număr mare de bacterii (10^5 – 10^6 cel/ g aliment), această nouă microfloră nu apare în intestin decât după 2 – 3 săptămâni de administrare. În consecință în condiții fiziologice convenționale, o modificare a florei nu poate fi obținută decât după o administrare prelungită și cu doze crescute de bacterii (minimum 10^6 cel/ g aliment, timp de 3 săptămâni).

VARIAȚII DETERMINATE DE GERMENI PATOGENI

Într-o infecție intestinală, numărul de bacterii patogene se situează între 10^7 – 10^9 cel/ g conținut intestinal. Pentru a iniția o enterită infecțioasă la un animal exenic, este suficient să i se administreze 10 celule de *Salmonella*, în timp ce pentru a obține același rezultat la un animal convențional, este nevoie de minimum 10^9 [Boland, 2000].

VARIAȚII DETERMINATE DE ALIMENTE

Toate modificările importante ale regimului alimentar (înțărcarea animalelor tinere, scoaterea la păşune a rumegătoarelor primăvara etc) provoacă un dismicrobism intestinal care conduce ulterior la dereglări digestive (diaree).

VARIAȚII DETERMINATE DE STRES

Stresul apare frecvent în creşterea intensivă a animalelor și de puține ori se iau măsuri pentru înlăturarea acestuia. Printre condițiile de stres se numără: înțărcatul, lotizarea animalelor, transportul, suprapopularea adăposturilor, manipularea nepotrivită a animalelor, măsurătorile etc.

Toate acestea duc adeseori la un dismicrobism intestinal, în cele mai multe cazuri constând într-o creştere a colibacililor și diminuare a lactobacililor.

VARIAȚII DETERMINATE DE AGENȚI ANTIMICROBIENI

Administrarea unei doze antiinfecțioase de antibiotice poate să atingă la nivelul intestinului o concentrație suficientă pentru a inhiba dezvoltarea unui mare număr de bacterii și de a provoca un dezechilibru a florei intestinale. Aceasta duce la diminuarea efectului de barieră a florei enterice și face subiectul mai receptiv la bacterii potențial patogene, rezistente la dozele antiinfecțioase folosite și, pe de altă parte, poate provoca un dezechilibru microbian cu consecințe economice (diminuarea performanțelor zootehnice).

Din studierea variațiilor microflorei intestinale se poate concluziona:

- o floră echilibrată, care implică un animal sănătos și bine hrănit, permite exploatarea la maxim a potențialului genetic a animalului (producții omogene);

- toate variațiile importante ale echilibrului acestei flore deschide poarta infecțiilor intestinale, în prezența agenților patogeni și sunt la originea diminuării randamentelor zootehnice (producții heterogene).

10.2.3. Microorganisme utilizate în produse cu efect probiotic

Microorganismele vii utilizate ca probiotice, în alimentația animală, sunt tulpini bacteriene aparținând grupurilor *Lactobacillus, Enterococcus* și *Bacillus* și drojdii din genul *Saccharomyces*.

Lactobacillus și *Enterococcus* sunt genuri bacteriene prezente în număr mare (10^4 - 10^8/g) în microflora digestivă a porcilor, vacilor și păsărilor. Din contră, tulpinile din genul *Bacillus* și drojdiile nu sunt locuitori obișnuiți ai florei digestive.

Dacă ameliorarea nutriției obținută prin ingestia de proteine microbiene este clasic admisă, mecanismele de acțiune, în ceea ce privește organismele vii, sunt și în prezent controversate, acestea trebuind să îndeplinească o serie de condiții pentru a putea acționa benefic asupra organismului animal. Pentru ca un microorganism să poată fi utilizat ca probiotic trebuie să întrunească o serie de criterii prealabile [De Roissart, 1994] și anume: *a) condiții specifice de implantare; b) rezistența la lizozim; c) toleranța la aciditatea gastrică; d) rezistența la săruri biliare.*

Microorganismele utilizate ca probiotice trebuie să depășească în principal trei obstacole majore în scopul tranzitării digestive înainte de implantarea și multiplicarea în intestinul subțire:

-în cavitatea bucală, ele sunt supuse acțiunii litice a lizozimului, prezent în cantitate mare în salivă;

- în stomac, trebuie să reziste la acțiunea unui pH foarte acid;
- în intestinul subțire, trebuie să reziste la acțiunea sărurilor biliare.

Rezistența la enzimele litice

Printre enzimele litice capabile de a liza peretele celular al bacteriilor gram pozitive, lizozimul pare a fi o enzimă deosebit de agresivă. Lizozimul este o β 1,4-glucanază care scindează specific legăturile β 1-4 dintre acidul muramic și resturile glucozaminice din partea glucidică a peptidoglicanului, și care reprezintă 80-90% din substanța uscată a peretelui celular al bacteriilor.

Microorganismele Gram-pozitive prezintă o sensibilitate deosebită la acțiunea lizozimului, care poate liza chiar și celule aflate în faza staționară de creștere, când pereții celulari sunt îngroșați. Acțiunea litică a lizozimului este potențată de către tripsină, care are rol benefic prin hidroliza părții peptidice a peptidoglicanului din peretele celular,favorizând accesul lizozimului la scindarea legăturilor β 1-4 dintre acidul muramic și N acetilglucozamina.

Unele tipuri de bacterii, printre care și bacteriile lactice, posedă însă o rezistență naturală la efectul litic al lizozimului, ceea ce permite trecerea lor prin

bariera bucală. Rezistența naturală a bacteriilor lactice poate fi explicată prin modificarea structurală a pereților celulari, semnalată la *Lactobacillus bulgaricus* când peretele celular este sensibil la activitatea enzimelor autolitice dar nu și a lizozimului.

Rezistența la pH-ul gastric

Pentru evaluarea toleranței tulpinilor la activitatea digestivă din stomac, tulpinile sunt supuse acțiunii unui suc gastric artificial, la pH=3 și la temperatura de 37°C. În aceste condiții bacteriile lactice au prezentat o viabilitate de 100%,timp de 3 ore. Dimpotrivă, *Bacillus subtilis* și drojdia metilotrofă *Hansenula polymorpha* nu-și păstrează viabilitatea decât în proporție de 50 și 70%

Rezistența la sărurile biliare

Rezistența bacteriilor față de sărurile biliare se efectuează pe medii selective conținând bilă. Tulpinile care se dezvoltă pot fi considerate gazde obișnuite ale intestinului. Există o relație strânsă între rezistența tulpinii la sărurile biliare și capacitatea de a coloniza intestinul subțire.

În concluzie pentru ca o bacterie să poată fi utilizată ca aditiv alimentar, cu rol de probiotic, este necesară o rezistență simultană la acidul gastric, la atacul enzimelor digestive și la acțiunea antibacteriană a sărurilor biliare.

În scopul eficientizării produselor de tip probiotic se iau în considerare:

a) caracteristicile tulpinilor microbiene și b) factorii implicați în condiționarea acestuia.

Criteriile pentru selecția tulpinilor sunt urmatoarele:

Habitatul original al tulpinilor

Ultimele rezultate experimentale au dus la concluzia că nu este obligatoriu ca tulpinile din componența probioticelor să facă parte din flora normală a intestinului speciei țintă. Pe de altă parte nu toate tulpinile unei specii bacteriene au aceeași eficacitate.

Rezistența la bariere fiziologice

Tulpinile microbiene care intră în componența probioticelor trebuie *să prezinte rezistență la lizozimul salivar, la aciditatea gastrică și la sărurile biliare.* Pentru bacteriile lactice enterice, foarte larg utilizate în produse de tip probiotic, aceste rezistențe fac parte din caracteristicile lor genetice.

Comportamentul tulpinii în tractul digestiv

Multiplicarea tulpinilor de tip probiotice în intestin trebuie să se facă obligatoriu într-un timp mai scurt decât timpul necesar tranzitării tubului digestiv, altfel ele vor fi eliminate în exterior. Acesta este cazul acelei părți a microflorei circulante din tractul intestinal, al cărui rol probiotic însă nu trebuie neglijat. Pentru ca o bacterie să fie și mai eficace și să se poată dezvolta mai bine, ea trebuie să ocupe mucusul, trebuie să adere la mucoasa intestinală, în mod special a ileonului, cecumului sau colonului. Aderarea la mucoasa intestinală nu este o condiție indispensabilă a colonizării. Bacteriile trebuie să fie capabile să se multiplice în mucus și să concureze eficient alte bacterii la partajul elementelor nutritive.

Rezistența la colonizarea intestinului

Pentru a proba eficacitatea unui probiotic administrat ca aditiv furajer este necesar să se verifice prezența tulpinii microbiene din probiotic într-o cantitate corespunzătoare administrării ei în mucusul intestinal și fecalele animalului. Eficacitatea unui probiotic se consideră bună dacă tulpina microbiană din componența lui începe să dispară după cel puțin 5 zile de la oprirea administrării lui. S-a constatat că tulpinile de lactobacili aderente la mucoasa intestinală pot să dispară spontan în 7 zile.

Orice tulpină microbiană care colonizează tractul intestinal și care se regăsește în fecale într-o concentrație mai mare de 10^5 cel/ g fecale, poate să modifice raportul bacteriilor preexistente în sistemul digestiv, și deci să joace rol de probiotic. Rapiditatea implantării lor este un criteriu de selecție a tulpinilor probiotice.

Pentru ca un microorganism să poată fi produs în sistem industrial trebuie să întrunească următoarele condiții:

- O tulpină care nu poate să atingă o concentrație de 10^9 celule / g produs atomizat (deshidratat la cald) sau de 10^{10} celule / g produs liofilizat (deshidratat la rece) nu poate să fie utilizată industrial.
- Microorganismul trebuie să se preteze la metodele de conservare convenționale de laborator (conserv vegetativ, congelare la –80°C, în azot lichid, sau prin liofilizare);
- să fie capabil să se dezvolte pe medii de cultură ieftine și accesibile;
- să prezinte stabilitate genotipică și fenotipică;
- să se dezvolte în instalații de biosinteză convenționale și convertibile pentru dezvoltarea altor microorganisme;
- să nu fie vătămător pentru mediul înconjurător, pentru oamenii care îl manipulează sau animalul țintă;
- să prezinte un procent de viabilitate cât mai mare și pe o perioadă cât mai lungă în condițiile de păstrare a produsului în componența căruia intră.

10.2.4. Condiționarea produselor cu efect probiotic; obținerea preparatului comercial

Există tendința de a se considera probioticele ca o familie de produse destinate să înlocuiască antibioticele, întrucât ele sunt în principiu susceptibile de a fi utilizate în terapie, profilaxie și nutriție. Însă probioticele, în concepția lor actuală, au domenii de aplicație mult mai restrânse decât antibioticele.

Dacă ne referim la observațiile făcute asupra cauzelor și consecințelor variației microflorei digestive, se pot întrevede două domenii de aplicații:

- în prevenirea dezechilibrului microflorei digestive (**efect profilactic**);
- restabilirea echilibrului când acesta este distrus (**efect terapeutic**).

Aceste obiective pot fi atinse administrând probioticul în primul caz ca medicament sau ca aditiv furajer, în al doilea caz

Pentru condiționare sunt necesare:
- microorganisme de tip probiotic;
- suportul de condiționare (excipientul);

Caracteristicile substanțelor active (microorganismele) sunt redate în paragraful anterior. Excipientul (vectorul substanței active) trebuie să protejeze microorganismul, să permită menținerea viabilității acestuia și să răspundă exigențelor viitoare utilizării probioticului. Excipientul nu trebuie să fie un substrat pentru dezvoltarea microorganismului, din contră, trebuie să conțină elemente de conservare până la utilizarea produsului. În mod contradictoriu este indicată totuși, înglobarea în produs de nutrienți care să permită multiplicarea microorganismului după administrarea produsului, în tubul digestiv.

Pentru un *probiotic-medicament*, excipientul trebuie să fie solubil dacă se administrează în apa de băut (calea cu efect curativ maxim). Pentru aceasta se apelează în general la glucide solubile, în particular la lactoză. S-au făcut cercetări pentru obținerea unor paste administrate oral sub forma unor puseuri galenice, obținându-se produse bine omogenizate care pot conserva microorganismele în stare viabilă un timp suficient de lung (1 an). Dăm în continuare câteva exemple de excipienți folosiți în produse comerciale de tip probiotic: lactoză (Fastrack – Liquid Dispersible, produs de Conklin – USA), celuloză (Fastrack – Ruminant Bolus – Conklin – USA), amestecuri de amidon din porumb, ulei de soia, silicon, dextroză (puseuri galenice Micromanager, USA), granule minerale (inoculant Pioneer – USA), granule de celuloză, silicați, bentonită, zeoliți, sticle, carbonat de calciu.

Pentru un *aditiv furajer*, unde substanța activă se amestecă în furaj, excipientul nu trebuie să fie contraindicat animalului. Pe de altă parte, volumul și textura lui trebuie să permită o amestecare ușoară și omogenă cu componentele furajului. Compania Diamond V – USA folosește un amestec de cereale măcinate ca excipient pentru drojdia *S. cerevisiae* folosită în hrana taurinelor.

10.2.5. Prezentarea probioticului și condițiile de păstrare

Deoarece probioticul poate fi utilizat atât ca medicament cât și ca aditiv, trebuie să poată fi conservat fie sub formă concentrată, fie în amestecuri, în excipientul său, sau în furaj. Preparatele medicamentoase și furajere sunt în mod normal stocate la temperaturi ambientale de 20 – 25°C, cu umiditate relativă de 70%. Sub formă de preparat concentrat, medicamentul sau aditivul furajer trebuie să poată fi păstrat cel puțin 12 luni. Pentru aceasta se impune ca umiditatea produsului să nu depășească 3%. După amestecarea lui în furaj, a cărui umiditate atinge în mod normal circa 14%, conservarea substanței active se poate reduce în jurul a 3 luni. Factorii enumerați trebuie luați în considerare, necunoașterea sau nerespectarea lor explică frecventele eșecuri în folosirea probioticelor.

În concluzie probioticele nu pot fi asimilate cu produsele antimicrobiene în general şi cu antibioticele în particular deoarece acţiunea lor este diferită. Rezultatele obţinute, în laboratoare şi în creşterea animalelor cu preparate de tip probiotic, pun bazele unor mari speranţe în viitorul acestui concept. Dacă izolarea şi selecţia tulpinilor, fabricarea produsului şi punerea lui în aplicare se realizează cu rigoare şi competenţă, se poate spera că utilizarea probioticelor va permite realizarea unor progrese importante în nutriţia animală şi umplerea "golurilor" lăsate în creşterea animalelor ca urmare a numeroaselor interdicţii impuse de organismele internaţionale în utilizarea antibioticelor ca factori de creştere, a făinurilor de origine animală, sau a sistemelor de exploatare generatoare de stres la animale. Astfel se poate veni în întâmpinarea noilor exigenţe de pe piaţa mondială, exigenţe reflectate de afirmaţia făcută de David Byrne, Comisia Europeană pentru Alimentaţie şi Sănătate Publică:

"Siguranţa este cel mai important ingredient din alimentele noastre. Europa trebuie să poată asigura consumatorul că noi putem aduce acest ingredient pe masa lui."

10.3. DROJDII FURAJERE

Preparatele pe bază de culturi de drojdie conţin de regulă, celule uscate de drojdie precum şi componente din mediul utilizat pentru dezvoltarea acestor celule. În prezent, produsele comerciale de drojdie folosite în hrana animalelor sunt derivate din culturi de *Saccharomyces cerevisiae.* Celulele din aceste preparate sunt uscate după o metodă tradiţională într-un-mod care le permite menţinerea viabilităţii şi activităţii metabolice. Aceste produse sunt în general recunoscute ca sigure şi pot fi utilizate ca aditivi furajeri naturali în diferite sisteme de creştere a animalelor. Utilizarea cu succes a acestor produse a generat interes ştiinţific considerabil în ultimii douăzeci de ani şi a devenit parte componentă acceptată în multe sisteme de creştere a animalelor [Boland, Alltech, 2000].

O mai bună înţelegere a rolului culturilor de drojdie în raţiile pentru animale şi a efectelor acestora asupra populaţiilor microbiene gastro-intestinale a dus la apariţia unor serii de strategii de suplimentare atestate ştiinţific, care măresc performanţa animalelor şi le îmbunătăţesc sănătatea. S-au făcut eforturi intense în domeniul cercetării pentru descrierea mecanismelor care stau la baza efectelor benefice ale culturilor de drojdie la multe loturi de animale. Totuşi, majoritatea programelor de cercetare de succes au analizat efectele culturilor de drojdie la animalele rumegătoare. Din aceste cercetări reiese că suplimentele derivate din culturi de drojdie pot modifica pozitiv activităţile microbiene din rumen şi intestin. Scopul multor activităţi de cercetare a fost acela de a defini strategiile de aplicare şi procedeele care pot îmbunătăţi răspunsurile animalelor la aceste suplimente microbiene.

10.3.1. Efectele culturilor de drojdie în producțiile animale

Efectele anumitor preparate pe bază de culturi de drojdie asupra performanței rumegătoarelor au fost bine documentate în ultimii douăzeci de ani. Răspunsurile benefice în producție au fost măsurate atât în sisteme de creștere a vacilor de lapte, cât și în sisteme de producție a cărnii. În mod obișnuit s-au utilizat două metode diferite de abordare pentru examinarea răspunsurilor la cultura de drojdie în producție la vacile de lapte.

Prima utilizează modele experimentale care compară producția de lapte de la loturile de animale tratate cu supliment pe bază de drojdie cu cele de la loturile martor la care s-au administrat rații nesuplimentate. Aceste tipuri de studii permit o evaluare atentă a efectelor preparatelor de drojdie în condiții controlate de laborator, dar utilizează numai un număr limitat de animale. Astfel de studii demonstrează că se pot obține răspunsuri benefice la strategiile de suplimentare a furajelor cu drojdie.

A doua abordare experimentală utilizează studii practice pentru demonstrarea efectelor culturilor de drojdie prin compararea producției de lapte în timpul unei perioade de suplimentare cu cea observată în timpul unei perioade similare când animalelor li se administrează rații nesuplimentate. Astfel de studii practice sunt adesea mai puțin controlate și necesită înțelegerea multor factori care influențează producția animală într-un ciclu normal de producție. Rezultatele acestor studii practice sunt adesea raportate în publicații științifice. Totuși, ele permit evaluarea preparatelor pe bază de cultură de drojdie în condiții care reflectă o aplicație practică a suplimentelor în producție și pot fi utilizate pentru evaluarea strategiilor de suplimentare pe efective mari de animale. În douăzeci și două de studii efectuate pe *Yea-Sacc*^{1026} (produs comercial care are la bază tulpina *S. cerevisiae NCYC 1026*), în care au fost implicate 9039 vaci de lapte, suplimentarea a dus la o creștere medie de 7,3% a producției de lapte [Dawson, Alltech, 2000]. Răspunsurile la suplimentare au fost variabile, cu limite de creștere a producției de lapte de la 2% la 30%. În mod similar s-au observat răspunsuri la cultura de drojdie în creșterea animalelor pentru producția de carne. Răspunsurile la cultura de drojdie utilizate la animalele rumegătoare în creștere au fost și ele variabile și cu limite de la o creștere nesemnificativă a sporului mediu zilnic la creșteri de peste 20%. Creșterea medie a sporului zilnic a fost de 8,7%. Studiile arată faptul că practicile de management, rațiile și stresul general influențează răspunsurile la suplimentarea cu această cultură de drojdie. În general, preparatele pe bază de culturi de drojdie sunt cel mai puțin eficace când animalele sunt hrănite cu rații bine echilibrate care favorizează stabilitatea populațiilor microbiene gastrointestinale și au efecte deosebit de pregnante în condiții de stres alimentar și stres datorat condițiilor de mediu. Totuși, datele dintr-o serie de studii controlate,

precum și din experimente practice, atestă faptul că suplimentele pe bază de culturi de drojdie pot avea rol semnificativ în strategiile pentru îmbunătățirea economică a performanței rumegătoarelor.

10.3.2. Efectele culturilor de drojdie asupra rumenului

Efectele suplimentelor pe bază de culturi de drojdie asupra populațiilor microbiene din rumen pot explica multe din efectele lor benefice la rumegătoare. Mai multe studii de laborator au analizat efectele culturilor de drojdie asupra activităților microbiene din rumen. Cercetătorii din aceste laboratoare au început să facă o descriere detaliată a efectelor pe care culturile de drojdie le au asupra rumenului. În vederea creării unui model, pentru explicarea efectelor drojdiei asupra performanței animalelor, este important să se facă o trecere în revistă a punctelor esențiale care au ajutat la definirea rolului drojdiei în rumen. Aceste sunt următoarele:

❖ **Suplimentele de drojdie stimulează creșterea microorganismelor benefice din rumen**

Mulți cercetători au atribuit efectele benefice ale culturii de drojdie direct modificărilor fermentației ruminale și ale populației microbiene din tractul digestiv. Capacitatea unor anumite preparate pe bază de culturi de drojdie de a stimula dezvoltarea bacteriilor ruminale și de a mări concentrațiile anumitor bacterii benefice din rumen a fost bine documentată (tabelul 10.5).

Creșterea concentrațiilor de bacterii anaerobe și de bacterii celulozolitice din rumen a fost unul din răspunsurile la cultura de drojdie cel mai constant măsurate în rumen. Alte studii au arătat, totuși, că preparatele pe bază de culturi de drojdie pot accelera dezvoltarea bacteriilor utilizatoare de acid lactic, a bacteriilor proteolitice și a bacteriilor care convertesc în rumen hidrogenul molecular în acetat. În plus, preparatele pe bază de drojdie îmbunătățesc activitățile fungilor care digeră celuloza în rumen. Mărirea concentrațiilor microorganismelor benefice și accentuarea activităților microbiene pot duce la îmbunătățirea proceselor digestive și implicit la distrugerea produșilor intermediari de metabolism care pot induce disfuncții ruminale. Capacitatea drojdiei de a stimula anumite grupe de bacterii este corelată cu multe din alte efecte fiziologice sau metabolice ale drojdiei observate în rumen și poate explica îmbunătățirea sintezei proteice, îmbunătățirea stabilității ruminale și îmbunătățirea activităților microbiene.

Tabelul 10.5

Efectele suplimentelor pe bază de culturi de drojdie asupra bacteriilor selecționate din populațiile bacteriene ruminale

Grupa de microorganisme	Creşterea concentrației (%)	Referință bibliografică
Bacterii anaerobe	31	Wiedmeier şi col., 1987
	58	Harrison şi col., 1988
	490	Dawson şi col., 1990
	82-95	El Hassan şi col., 1992
	15-62	Newbold şi col., 1995
	34	Kumar şi col., 1997
Bacterii celulozolitice	58	Wiedmeier şi col., 1987
	82	Harrison şi col., 1988
	812	Dawson şi col., 1990
	113-246	Newbold şi col., 1995
	56	Kumar şi col., 1997
Bacterii lactice	0-58	Girard şi col., 1993

❖ **Doar celulele de drojdie active din punct de vedere metabolic au activități stimulatorii**

Mai mulți cercetători au stabilit importanța celulelor de drojdie viabile şi active din punct de vedere metabolic dintr-un preparat pe bază de cultură de drojdie pentru activități de stimulare optime în rumen. Preparatele pe bază de culturi de drojdie autoclavate au fost ineficiente în ceea ce priveşte sporirea numărului de bacterii viabile în rumen. Totuşi, celulele de drojdii iradiate care nu se pot înmulți, dar îşi păstrează activitățile metabolice au fost utilizate cu succes pentru stimularea activităților microbiene în rumen. Aceste studii arată că activitatea metabolică şi reproducția non-activă fac parte din procesul de bază care duce la un răspuns benefic maxim la suplimentarea cu drojdie. Necesitatea de a avea drojdie activă din punct de vedere metabolic trebuie luată în considerare în orice model utilizat pentru explicarea efectelor generale ale drojdiei în rumen.

❖ **Suplimentarea pe bază de cultură de drojdie influențează metabolismul acidului lactic ruminal**

Multe studii au demonstrat un rol al culturii de drojdie în stabilizarea fermentației ruminale şi efectul benefic al acesteia de reducere a tulburărilor ruminale. La animalele hrănite cu rații având un nivel energetic ridicat, rezultând

un pH scăzut în rumen, se impune scăderea concentrațiilor de acid lactic rezultat în rumen, asociată cu un pH ruminal mai ridicat, și deci, o fermentație ruminală mai stabilă. Capacitatea drojdiei de a preveni acumularea de acid lactic în rumen îi conferă acesteia un rol în depășirea disfuncțiilor ruminale. Drojdia viabilă se poate utiliza cu succes în condițiile administrării rațiilor cu nivel energetic ridicat, la vacile de lapte de mare productivitate și la taurinele de carne cu creștere rapidă.

❖ **Suplimentarea cu drojdie influențează digestia ruminală**

Majoritatea cercetătorilor sunt de acord că strategiile de suplimentare cu produse pe bază de drojdie pot avea efecte măsurabile asupra fermentației ruminale și duc la modificări benefice ale digestiei. Studiile efectuate în mai multe laboratoare au demonstrat că suplimentarea pe bază de culturi de drojdie poate influența procesele digestive în rumen. În aceste studii rata inițială de digestie a fost rapid influențată de adăugarea de preparate de drojdie în rațiile rumegătoarelor. Aceasta este o caracteristică a suplimentării cu drojdie care a fost măsurată atât *in vitro*, cât și *in vivo*. Deoarece ingesta de furaje este adesea corelată cu rata de digestie a celulozei, stimularea activității ruminale poate avea un impact major asupra consumului de furaj și poate fi o modalitate de îmbunătățire a performanțelor animalelor. Studiile mai sus menționate atestă rolul important în digestia furajelor a suplimentării cu produse pe bază de culturi de drojdie a rațiilor formate din cantități mari de nutrețuri de volum.

❖ **Nu toate tulpinile de drojdii au aceleași activități stimulatorii**

Mai multe studii au demonstrat că nu toate tulpinile de drojdie sunt la fel de capabile de a stimula bacteriile ruminale. Dovada diferențelor între tulpini a fost obținută din studii ale diferitelor tulpini atât pe culturi pure de bacterii ruminale cât și pe populații mixte. Numai 7 din cele peste 50 de tulpini testate au avut capacitatea de a stimula dezvoltarea bacteriilor care digeră celuloza din rumen. Alte studii arată că puține tulpini de drojdie au capacitatea de a stimula atât bacteriile benefice care digeră celuloza, cât și bacteriile asociate, responsabile de utilizarea lactatului. În mod similar, Dawson și col. [Alltech, 2002] au demonstrat că tulpinile de drojdie utilizate în fermentarea alcoolului și cele utilizate în panificație prezintă diferențe în capacitățile lor de stimulare a grupelor critice de microorganisme ruminale (figura 10.4).

Tulpinile de drojdie de panificație au o capacitate limitată de a stimula bacteriile ruminale. Aceste studii arată că trebuie acordată o grijă deosebită în selectarea tulpinilor de *Saccharomyces cerevisiae* care urmează a fi folosite ca biostimulatori în hrana animalelor. Explicând-se astfel și o parte din variabilitatea răspunsurilor din producție. Se pare că multe din studiile anterioare s-au bazat pe suplimente de culturi de drojdie slab definite și este posibil să se fi utilizat tulpini cu activități stimulatorii scăzute.

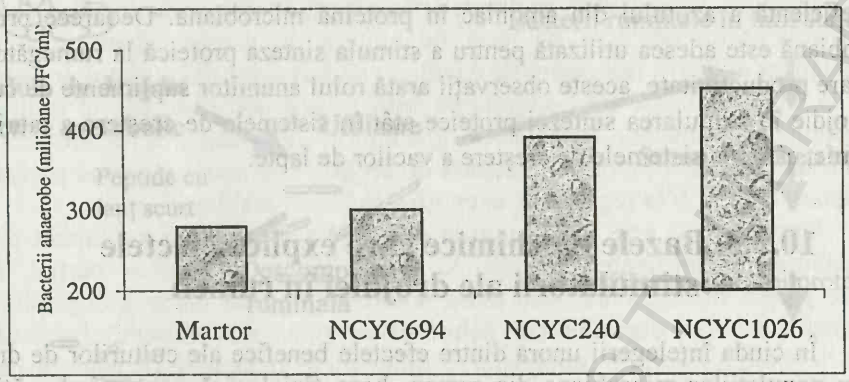


Figura 10.4. Efectele mai multor tulpini de drojdie asupra concentrațiilor de bacterii într-o populație ruminală mixtă (adaptare după Dawson și col., 2002)

❖Suplimentarea cu cultură de drojdie modifică metabolismul ruminal al azotului

Mai multe rezultate experimentale arată faptul că suplimentarea pe bază de cultură de drojdie poate modifica benefic metabolismul azotului în rumen (tabelul 10.6.). Acest lucru se reflectă în reducerea concentrațiilor de amoniac ruminal observate la animalele tratate cu suplimente de drojdie și este corelat cu creșterea concentrației de bacterii din rumen.

Tabelul 10.6

Efectele produsului Yea – Sacc^{1026} asupra ingestiei de azot și a fluxului azotului către intestinul subțire la o vacă de lapte

Specificare	Tratament alimentar	
	Nesuplimentat	Suplimentare cu o cultură de drojdie
Consum de azot (g /zi)	535	526
Flux spre intestin subțire (g N/zi):		
Azot neamoniacal	446	488
Azot microbian	255	293
Azot alimentar	191	195
Azot microbian (% din N ingerat)	47,6	55,7

În plus aceste modificări sunt reflectate în creșterea fluxului de azot bacterian către intestinul subțire. Modificarea fluxului de azot a fost asociată cu modificările fluxului de aminoacizi esențiali în afara rumenului. Această creștere

benefică a fluxului de proteină microbiană din rumen este corespunzătoare modelelor care estimează stimularea dezvoltării microbiene în rumen şi conversia mai eficientă a azotului din amoniac în proteină microbiană. Deoarece proteina microbiană este adesea utilizată pentru a stimula sinteza proteică la rumegătoarele de mare productivitate, aceste observaţii arată rolul anumitor suplimente de cultură de drojdie în stimularea sintezei proteice atât în sistemele de creştere a taurinelor de carne, cât şi în sistemele de creştere a vacilor de lapte.

10.3.3. Bazele biochimice care explică efectele stimulatorii ale drojdiei în rumen

În ciuda înţelegerii unora dintre efectele benefice ale culturilor de drojdie asupra populaţiilor microbiene din rumen, baza fiziologică pentru îmbunătăţirea dezvoltării microbiene nu a fost descrisă în întregime. S-au emis un număr de mecanisme biochimice specifice ipotetice pentru explicarea efectelor stimulatorii ale culturilor de drojdie în rumen. Unele dintre acestea s-au bazat pe capacitatea drojdiei de a furniza nutrienţi importanţi sau co-factori nutriţionali care stimulează activităţile microbiene în vreme ce altele arată că este importantă capacitatea drojdiei de a controla nivelurile de oxigen din mediul ruminal. Alte modele mai recente arată că drojdia poate furniza un element important pentru dezvoltarea unei populaţii microbiene stabile. În acest model, drojdia furnizează elementele necesare pentru schimburile metabolice şi un mediu care favorizează dezvoltarea microorganismelor benefice în jurul substraturilor. Aceste modele au multe trăsături atractive, dar sunt limitate individual în capacitatea lor de a explica toate efectele asociate cu suplimentarea cu drojdie în rumen.

Studii recente au arătat că mecanismele de bază sunt implicate în stimularea generală a bacteriilor ruminale benefice. Aceste studii au dus la izolarea unui grup de compuşi care conţin azot şi care stimulează bacteriile să intre într-o creştere logaritmică şi astfel să intensifice activităţile microbiene. Trăsăturile chimice de bază ale acestor compuşi stimulatori sunt corespunzătoare acelora ale peptidelor mici active din punct de vedere biologic. Activităţile stimulatorii ale acestor peptide mici pot fi uşor demonstrate în studii pe culturi pure de bacterii ruminale. S-a arătat că peptidele care conţin triptofan de sinteză produc efecte stimulatorii similare şi stimulează dezvoltarea bacteriilor reprezentative care digeră celuloza din rumen. Aceste activităţi stimulatorii nu au fost asociate cu aminoacizi individuali şi au apărut la concentraţii care erau mult mai mici decât acelea la care aceşti compuşi sunt consideraţi nutrienţi limitativi. În schimb, aceşti compuşi servesc ca stimulenţi metabolici pentru bacteriile ruminale benefice care intră într-o fază de creştere exponenţială. Această activitate stimulatorie pentru anumite tipuri de bacterii ruminale poate explica multe din efectele observate la cultura de drojdie în rumen. Un model ipotetic care explică acţiunea în rumen a peptidelor derivate din drojdie este prezentată în figura 10.5.

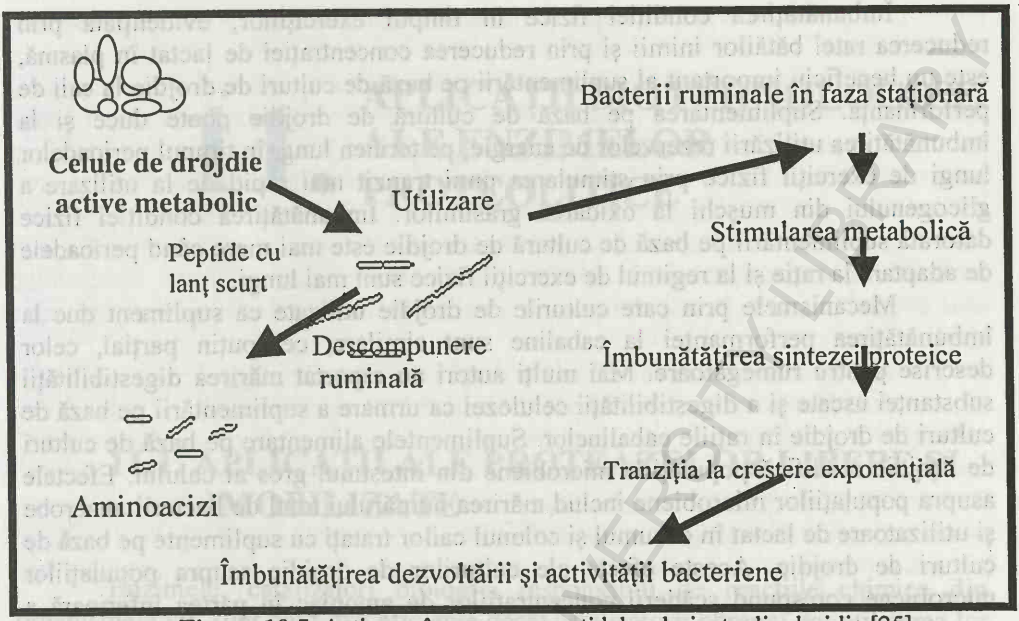


Figura 10.5. Acțiunea în rumen a peptidelor derivate din drojdie [25]

Peptidele stimulatorii nu sunt stabile în aparență în mediul ruminal. Încercările de măsurare a prezenței lor în fluidul din rumen au rămas fără succes. Activitățile enzimatice proteolitice și utilizarea rapidă a peptidelor de către microorganisme elimină probabil acești compuși din rumen foarte rapid. Această observație corespunde cerințelor pentru producerea preparatelor de drojdie activă metabolic, aspect care a fost observat de mai mulți cercetători. Celulele de drojdie active din punct de vedere metabolic constituie o sursă continuă de astfel de peptide și pot furniza continuu cantități mici necesare stimulării bacteriilor ruminale benefice. Împreună, aceste observații arată că efectele stimulatorii ale drojdiei pot fi explicate prin prezența acestor compuși activi din punct de vedere biologic în rumen.

10.3.4. Efectele culturilor de drojdie în alte zone ale tractului digestiv

În ultimii douăzeci de ani, studiile pe culturi de drojdie la cabaline au demonstrat în mod clar un rol al suplimentării pe bază de culturi de drojdie și în alte zone ale tractului gastrointestinal. Cercetările efectuate pe suplimentarea pe bază de culturi de drojdie în rațiile pentru cabaline nu sunt la fel de detaliate ca cele efectuate pe rumegătoare. Totuși s-au publicat studii cu privire la efectele suplimentării pe bază de culturi de drojdie asupra performanței cabalinelor, a digestibilității și a caracteristicilor fermentației din intestinul gros.

Îmbunătățirea condiției fizice în timpul exercițiilor, evidențiată prin reducerea ratei bătăilor inimii şi prin reducerea concentrației de lactat în plasmă, este un beneficiu important al suplimentării pe bază de culturi de drojdie la caii de performanță. Suplimentarea pe bază de cultură de drojdie poate duce şi la îmbunătățirea utilizării rezervelor de energie, pe termen lung, în timpul perioadelor lungi de exerciții fizice prin stimularea unui tranzit mai rapid de la utilizare a glicogenului din mușchi la oxidarea grăsimilor. Îmbunătățirea condiției fizice datorată suplimentării pe bază de cultură de drojdie este mai mare când perioadele de adaptare la rație şi la regimul de exerciții fizice sunt mai lungi.

Mecanismele prin care culturile de drojdie utilizate ca supliment duc la îmbunătățirea performanței la cabaline sunt similare, cel puțin parțial, celor descrise pentru rumegătoare. Mai mulți autori au raportat mărirea digestibilității substanței uscate şi a digestibilității celulozei ca urmare a suplimentării pe bază de culturi de drojdie în rațiile cabalinelor. Suplimentele alimentare pe bază de culturi de drojdie modifică populațiile microbiene din intestinul gros al calului. Efectele asupra populațiilor microbiene includ mărirea numărului total de bacterii anaerobe şi utilizatoare de lactat în cecumul şi colonul cailor tratați cu suplimente pe bază de culturi de drojdie. Aceste efecte ale culturilor de drojdie asupra populațiilor microbiene corespund scăderii concentrațiilor de amoniac în partea inferioară a cecumului şi creşterii pH – ului în cecum, care se observă la animalele tratate cu aceste culturi de drojdie.

Suplimentarea pe bază de culturi de drojdie a rațiilor pentru cabaline modifică fiziologia microbiană în sensul îmbunătățirii activității celulazei, o mai mare concentrație de enzime care descompun celuloza şi creşterea raportului acetat / propionat în cecumul cailor tratați şi stabilizarea fermentațiilor. Modificările la nivelul populațiilor şi activităților microbiene pot explica, măcar în parte, mărirea digestibilității şi scăderea concentrației de lactat atribuite suplimentării pe bază de culturi de drojdie la cai.

10.3.5. Alte activități potențiale ale culturilor de drojdie în sistemele de creştere a animalelor

Este important să recunoaştem că efectele stimulatorii ale drojdiei viabile în rumen corespund numai câtorva din efectele benefice ale drojdiei în creşterea animalelor. Cercetările în acest domeniu au dus la apariția unor concepte noi, care s-au concretizat în stabilizarea de suplimente utile pentru animale. În prezent sunt disponibile produse pe bază de perete celular de drojdie care previn colonizarea intestinului de către microorganisme patogene, modifică structura populațiilor microbiene în tractul intestinal, modulează funcția imună şi modifică structura peretelui intestinal. Toate aceste descoperiri sunt urmarea unor studii aprofundate privind suplimentarea pe bază de cultură de drojdie şi sunt în prezent deopotrivă utilizate în strategiile de îmbunătățire a performanțelor la rumegătoare şi nerumegătoare.

11. APLICAȚII BIOTEHNOLOGICE ALE ENZIMELOR PROTEOLITICE

11.1. APLICAȚII ALE PROTEAZELOR LIBERE ŞI IMOBILIZATE

Enzimele, catalizatori biologici responsabili de reacțiile chimice din organismele vii, sunt mult mai eficiente decât catalizatorii chimici, iar utilizarea lor în biotransformări este un punct-cheie pentru dezvoltarea biotehnologiilor.

Aplicarea largă a enzimelor în sinteza unor compuşi bioorganici a fost împiedicată de existența unor concepții privind proprietățile enzimelor ca şi catalizatori, cum sunt labilitatea enzimelor, specificitatea îngustă de substrat, posibilitatea obținerii doar a izomerului natural, desfăşurarea reacțiilor enzimatice la diluții mari, numărul mic de enzime disponibile, necesitatea utilizării unor cofactori complecşi, dificultatea utilizării lor la scară industrială etc. Aceste concepții sunt depăşite astăzi. Se acceptă că enzimele prezintă o largă specificitate de substrat şi sunt catalizatori mai robuşti decât a fost general acceptat înainte. Mai mult, identificarea unui număr mare de extremofili şi a unor enzime termostabile a extins considerabil domeniul de utilizare al enzimelor. S-a dovedit că enzimele sunt capabile să catalizeze aproape orice transformare în chimia organică [Sheldon, 1993].

Relansarea biocatalizei s-a realizat cu aproximativ 30 de ani în urmă şi a fost susținută de apariția tehnologiei ADN recombinant. Ca urmare a acestei tehnologii, producția de enzime este mult mai eficientă, enzimele se obțin cu puritate mai mare şi la prețuri mult mai mici, iar numărul enzimelor disponibile este foarte mare. Dacă în trecut abordările genetice şi metodele sofisticate de recombinare genetică care urmăreau obținerea unor enzime de interes au fost restricționate la *E. coli*, în ultimii ani această situație a fost modificată radical. Prin utilizarea noilor tehnici ale ingineriei genetice bariera care împiedica schimbul de material genetic a fost înlăturată, aceasta mărind posibilitatea de acces la materialul genetic şi în cazul altor organisme în afară de *E. coli*.

În ultimii ani s-a urmărit clonarea unor gene care codifică enzime de importanță industrială. În ciuda numărului mare de gene clonate, microorganismele

modificate genetic în vederea obţinerii de enzime extracelulare în cantitate mare nu sunt suficiente.

Cel mai mare avantaj al utilizării enzimelor ca şi catalizatori ai reacţiilor chimice şi biochimice este selectivitatea lor deosebită. Enzimele sunt utilizate pentru a creşte selectivitatea chimică sau regioselectivitatea reacţiilor şi, mai ales, pentru capacitatea lor de a face diferenţa dintre cei doi enantiomeri ai unui substrat cu activitate optică. În industria farmaceutică obţinerea unor compuşi optic puri este un deziderat de la care nu se poate face rabat, având în vedere că cele mai multe dintre medicamentele de generaţie nouă sunt molecule chirale. Biocataliza este singura tehnologie capabilă de o astfel de performanţă în ceea ce priveşte selectivitatea.

În biotransformări se utilizează ca şi catalizatori toate cele şase clase de enzime, oxidoreductaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze şi ligaze. În aplicaţiile la scară mare se utilizează mai ales hidrolazele şi, la o scară mai redusă, liazele şi izomerazele, care nu necesită cantităţi stoechiometrice de cofactor. Datorită faptului că oxidoreductazele sunt cofactor – dependente, ele se utilizează în general ca celule întregi şi nu ca enzime libere. Transferazele şi ligazele necesită în general cofactori complecşi şi, până în prezent, şi-au găsit puţine aplicaţii sintetice, deşi ligazele se utilizează curent în ingineria genetică.

Proteazele constituie una dintre cele mai importante grupe de enzime industriale, reprezentând un sfert din totalul enzimelor vîndute pe plan mondial.

În funcţie de structura situsului catalitic activ proteazele utilizate industrial se clasifică în:

- Serin-proteinaze - au un rest de serină în centrul activ care participă la cataliză, prezintă activitate catalitică maximă în domeniul de pH neutru-alcalin cuprins între 8-11 şi sunt inhibate de diizopropilfluorofosfat (DFP) şi fenilmetilsulfonilfluorură (PMSF). Proteazele digestive de origine animală au fost primele caracterizate din acest grup, dar subtilizina din *Bacillus subtilis* ca şi alte enzime bacteriene înrudite au fost mult studiate datorită utilizării lor în industria detergenţilor.
- Tiol-proteinaze - folosesc gruparea SH în cataliză, acţionează în domeniul de pH neutru şi sunt inhibate de PMSF. În scopuri comerciale ele sunt obţinute din plante (papina şi bromelaina), dar se urmăreşte obţinerea lor din culturi celulare sau prin fermentaţie din microorganisme modificate genetic cu gene de plante.
- Carboxi-proteinaze - utilizează în mecanismul catalitic o grupare carboxilică, în special un rest de acid aspartic. Sunt reprezentate de enzimele acide din stomacul animalelor superioare, dar sunt de asemenea răspândite şi la nivelul fungilor. Au un pH optim acid. Proteazele acide sunt inhibate de PMSF şi "pepstatina A", care este o enzimă extracelulară cu o structură foarte complexă produsă de fungii din specia *Streptomyces*.
- Metalo-proteinaze - conţin ioni metalici legaţi în centrul catalitic care participă la cataliză şi sunt inhibate de agenţi de chelatizare cum este EDTA. Ele sunt active în domeniul neutru de pH şi sunt răspândite în bacterii şi fungi. Din această clasă face parte termolizina [Frost, 1987].

Multe din proteazele utilizate la scară industrială au fost modificate în vederea obținerii unor enzime capabile să funcționeze în condițiile specifice impuse de tehnologia industrială (valori caracteristice de pH, temperatură, prezența solventului organic, a unor săruri sau inhibitori în mediul de reacție).

Subtilizina a fost prima enzimă supusă ingineriei proteinelor cu scopul de a-i îmbunătăți proprietățile în scopuri comerciale. Promotorul α-amilazei din *Bacillus amyloliquefaciens* a fost substituit cu promotorul subtilizinei pentru a obține randamente crescute în subtilizină [Wells, 1983]. Gena termolizinei din *Bacillus stearotermophilus* a fost clonată și s-a exprimat într-o tulpină slab producătoare de proteze de *Bacillus stearotermophilus* și *Bacillus subtilis.* Tulpina recombinantă de *Bacillus stearotermophilus* a produs de 15 ori mai multă proteinază decât tulpina donoare [Fuji, 1983]. Proteaza neutră a fost produsă de către o tulpină transformată de *Bacillus subtilis* la un nivel de 50 de ori mai ridicat decât de tulpina parentală de *Bacillus stearotermophilus* din care provine [Honjo, 1984].

Perfecționarea tehnicilor de clonare genetică a permis obținerea proteinelor de origine animală sau vegetală în culturi de microorganisme. Unul dintre primele obiective ale acestor cercetări a fost obținerea reninei de vițel de către bacterii.

Metodele de inginerie genetică sunt deosebit de importante în obținerea de tulpini rezistente, înalt producătoare de proteinaze, care practic au înlocuit tulpinile sălbatice puțin rezistente, cu activitate scăzută și care în general secretă mai multe tipuri de enzime concomitent [Frost, 1987].

La ora actulă se obțin și se comercializează o gamă variată de enzime proteolitice, mai ales de origine microbiană, sub formă de preparate enzimatice cu diferite grade de puritate și care sunt utilizate în industria detergenților, în hidroliza proteinelor, industria berii, cărnii și laptelui, în panificație, industria farmaceutică, industria fotografică, industria tăbăcăriei și blănurilor, în scopuri analitice, zootehnie etc. Proteazele microbiene comerciale utilizate în diferite aplicații sunt prezentate în tabelul 11.1 [Bommarius, 2004].

Tabelul 11.1.

Proteaze microbiene comerciale

Firma producătoare	Denumirea comercială	Sursa microbiană	Aplicații
Novo Nordisk, Danemarca	Alcalase	*Bacillus licheniformis*	Detergenți, industria mătăsurilor
	Savinase	*Bacillus* sp.	Detergenți, textile
	Esperase	*Bacillus lentus*	Detergenți, produse alimentare, industria mătasurilor
	Biofeed pro	*Bacillus licheniformis*	Hrana animală
	Durazym	*Bacillus* sp.	Detergenți
	Novozyme 243	*Bacillus licheniformis*	Igiena dentară
	Nue	*Bacillus* sp.	Industria pielăriei

Genencor Int., USA	Purafact Primatan	*Bacillus lentus* Sursă bacteriană	Detergenți Industria pielăriei
Gist-Brocades, Olanda	Subtilisin Maxacal Maxatase	*Bacillus alcalophilus* *Bacillus* sp. *Bacillus* sp.	Detergenți Detergenți Detergenți
Solvay Enzymes, Germania	Opticlean Optimase Maxaperm HT proteolytic	*Bacillus alcalophilus* *Bacillus licheniformis* *Bacillus* sp. *Bacillus subtilis*	Detergenți Detergenți Detergenți Industria alcoolului, pâinii, berii, hrana umană și animală, industria pielăriei
Rohm, Germania	Corolase 7089	*Bacillus subtilis*	Produse alimentare
Amano Pharmaceuticals, Japan	Proleather Collagenase Amano Protease S	*Bacillus* sp. *Clostridium* sp. *Bacillus* sp.	Produse alimentare Produse tehnice Produse alimentare
Enzyme Development, USA	Enzeco	*Bacillus licheniformis*	Produse industriale Produse alimentare
Nagase Biochemicals, Japan	Bioprase concentrate Ps. Protease Bioprase Bioprase SP-10	*Bacillus subtilis* *Pseudomonas aeroginosa* *Bacillus subtilis*	Cosmetice, produse farmaceutice Cercetare Detergenți Produse alimentare
Wuxi Synder Bioproducts, China	Wuxi	*Bacillus* sp.	Detergenți
Advance Biochemicals, India	Protosol	*Bacillus* sp.	Detergenți

Se observă că producătorii de enzime s-au axat pe producerea de proteaze mai ales pentru detergenți, industria brânzeturilor și alte aplicații cu potențial economico – financiar ridicat și nu de enzime pentru sinteza organică. Cu toate acestea, aplicațiile în sinteza organică pot beneficia de dezvoltarea unor enzime cu proprietăți îmbunătățite destinate diferitelor industrii. Într-adevăr, multe enzime utilizate în sinteza organică enantioselectivă au fost dezvoltate pentru alte aplicații (ex. subtilizina obținută pentru industria detergenților).

Enzimele în general și proteazele în special sunt utilizate în biotransformări în formă solubilă sau imobilizate. Enzimele se denumesc imobilizate (sinonim cu

fixate de suport, legate de suport, insolubilizate) dacă sunt *legate chimic* sau prin *adsorbție* de diverse materiale suport (matrici) sau *entrapate* în formă solubilă în microcapsule sau membrane, impermeabile pentru enzimă și care permit un schimb continuu de substrat sau produs [Bickerstaff, 1997]. Principalul scop al imobilizării, care leagă toate aceste variante enunțate mai sus, este posibilitatea de separare și recirculare a enzimei, în aplicațiile ei biotehnologice [Chibata, 1978, Woodward, 1985].

Progresele făcute în ultimii 40 de ani în domeniul bioimobilizării se concretizează printr-o utilizare la scară mare a acestora în extracția, separarea, obținerea, conversia și detectarea selectivă a reactivilor. Utilizarea în aceste aplicații a unor specii biologice cum sunt proteinele, peptidele, acizii nucleici și chiar celulele întregi se datorează în cea mai mare parte succesului cu care se reușește imobilizarea speciilor biologice intacte pe sau în interiorul unei suprafețe corespunzătoare. Pentru ca utilizarea bioimobilizatelor să fie eficientă, acestea trebuie să îndeplinească o serie de cerințe [Bickerstaff, 1997, Chibata, 1978, Woodward, 1985]:

- densitatea biomoleculelor imobilizate să fie mare
- să prezinte o mare activitate enzimatică
- să fie stabile la temperatură și în timp
- să permită o bună accesibilitate analiților chimici
- să răspundă rapid în timp
- să fie rezistente la desprindere/desorbție.

Biocatalizatorii oferă numeroase avantaje pentru a înfăptui obiectivele chimiei ecologice: producții mari pe o cale scurtă cu etape puține (ceea ce înseamnă implicit număr mic de intermediari), selectivitate crescută, necesitatea unor temperaturi și presiuni scăzute. Biocatalizatorii, la fel ca și multe din materialele naturale, în special cele utilizate în fermentații, sunt complet biodegradabili și de cele mai multe ori nu dăunează omului sau animalelor.

11.2. REACȚII CATALIZATE DE PROTEAZE ÎN MEDIU APOS ȘI ORGANIC

11.2.1. Generalități

Studiul compușilor biologic activi a dus la concluzia că la nivel molecular procesele biologice sunt dominate de asimetrie și chiralitatea joacă un rol important în activitatea biologică.

S-a observat că apar diferențe între activitățile biologice ale celor doi enatiomeri generați de un centru de chiralitate. Acest fenomen general se aplică în cazul tuturor substanțelor biologic active, cum sunt medicamentele, agrochimicalele, odorizanții și aromatizanții, aditivii alimentari. Faptul că

componentele moleculare ale organismelor vii sunt în marea lor majoritate chirale explică de ce asimetria joacă un rol atât de important în interacțiunea cu aceste substanțe biologic active.

Cele mai multe medicamente naturale sunt molecule chirale şi ele există în natură, de regulă sub forma enatiomerului activ. Percepția gustului şi mirosului, efectele pesticidelor, implică interacțiunea cu receptorii, care la rândul lor sunt molecule chirale. Deci, enatioselectivitatea în acțiunea biologică trebuie privită ca o regulă şi nu ca o excepție, iar metodele enatioselective prin care să se obțină enantiomeri optic puri sunt o necesitate [Sheldon, 1993].

Metodele chemocatalitice duc la obținerea amestecului racemic al compusului optic activ, ceea ce impune o serie de etape suplimentare de separare a enatiomerilor. Din aceste considerente şi ținând cont de calitățile prezentate de enzime (sunt catalizatori foarte eficienți, prezintă regio şi stereoselectivitate înalte, necesită condiții blânde de acțiune etc.) este evidentă utilizarea enzimelor în obținerea enantiomerilor optic puri.

Majoritatea transformărilor enzimatice ce vizează obținerea de compuşi optic activi sunt procese hidrolitice (multe implică utilizarea proteazelor), în general rezoluții cinetice. Rezoluția cinetică poate fi definită ca un proces în care unul dintre enantiomerii unui amestec racemic este transformat mai rapid decât celălalt, reacția oprindu-se la o conversie cuprinsă între 0 şi 100%. În cazul ideal, o reacție decurge mult mai repede ca cealaltă şi un amestec inițial 50/50, la o conversie de 50%, conduce la 50% reactant şi 50% produs.

Succesul rezoluției cinetice depinde de diferența de viteză cu care reacționează enantiomerii unui amestec racemic cu un reactant chiral. Raportul enantiomeric, E, este o măsură a eficacității rezoluției cinetice. El este raportul constantelor de viteză de ordin pseudo întâi ale celor doi enantiomeri, adică într-o reacție în care enantiomerul S reacționează selectiv, $E_S = k_S/k_R$. Conducând reacția la conversii convenabile, se poate obține cu puritate optică mai mare fie enantiomerul mai reactiv, fie cel mai puțin reactiv. Puritatea optică reprezintă excesul unui enantiomer față de celălalt. Astfel, o probă cu puritate optică 90% conține unul dintre enantiomeri în proporție de 90%, iar 10% este amestecul racemic al celor doi enantiomeri. Dacă proba conține un singur enantiomer se spune că este pură din punct de vedere enantiomeric, sau are exces enantiomeric (ee) de 100%.

Excesul enantiomeric se poate defini prin formula:

$$ee\ (\%) = \frac{R - S}{R + S} \cdot 100 \qquad R > S \quad ,$$

R, S = numărul de moli ai celor doi enantiomeri generați de un centru de chiralitate

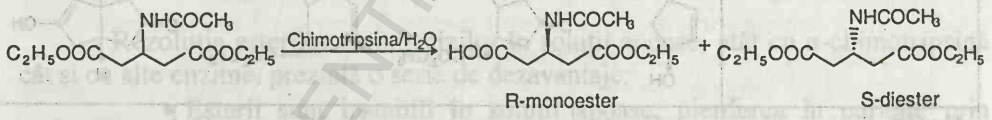
Numărul total de etape este important în economicitatea oricărui proces. Mai multe etape înseamnă un timp de reacție mai lung, costuri mai mari și productivități mai mici. Poziția etapei de rezoluție enzimatică în sinteză are de asemenea un rol în economicitatea reacției. Procesul este cu atât mai eficient cu cât treapta de rezoluție se găsește mai în față în succesiunea de etape.

Un alt factor care influențează numărul total de etape ale procesului de rezoluție este natura substratului, și anume dacă substratul este un precursor sau un derivat al produsului racemic. Astfel, o rezoluție a unui precursor necesită cu două etape mai puțin decât procesul echivalent care implică rezoluția unui derivat al substanței de separat. De exemplu, în rezoluția esterilor de aminoacizi se poate lucra în două variante: cu esteri de aminoacizi neacilați, sau esteri de N-acil-aminoacizi, ceea ce implică o etapă de derivatizare în plus [Sheldon, 1993, Preda, 2000].

11.2.2. Reacții catalizate de proteaze în mediul apos

Alături de alte hidrolaze, enzimele proteolitice joacă un rol foarte important în sinteza selectivă a compușilor optic activi.

Utilizarea proteazelor, și anume a chimotripsinei, în hidroliza enantioselectivă a unui ester a fost menționată prima dată în 1961. Ca substrat s-a folosit un diester etilic N-acilat, prochiral, transformat selectiv de chimotripsină în mediu apos în R-monoester [Sheldon, 1993].



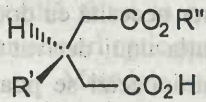
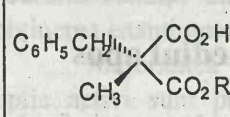
α-Chimotripsina (EC 3.4.21.1) este una dintre cele mai studiate enzime. Este o serin-proteinază cu pH optim de acțiune de 7,8, o endopeptidază cu selelctivitate pentru legăturile peptidice formate de fenilalanină, tirozină sau triptofan.

Reacțiile de hidroliză catalizate de α-chimotripsină au fost conduse în soluție apoasă la pH 7-8. S-au utilizat substraturi prochirale, esteri ai derivaților de acid malonic și glutaric, din care s-au obținut monoesterii corespunzători (tabelul 11.2) [Gais, 1995].

De asemenea enzima a fost utilizată și în rezoluția unui număr mic de esteri cu structură ciclică (tabelul 11.3) [Gais, 1995].

Tabelul 11.2.

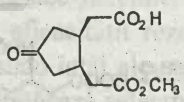
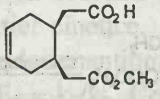
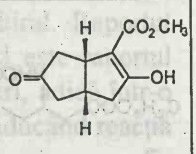
Hidroliza unor esteri dicarboxilici cu α-chimotripsină în mediu apos

	R'	R''	Exces enantiomeric (%)	Randament (%)
	HO-	CH_3-	64	100
	C_6H_5COO-	CH_3-	84	68
	$C_6H_5CH_2$-	CH_3-	92	86
	CH_3OCH_2-	CH_3-	93	100
	CH_3COO-	CH_3-	90	38
	HO-	CH_3-	55	78
	CH_3COO-	C_2H_5-	95	84
	CH_3CONH-	C_2H_5-	>95	79
	CH_3-		>98	90-98*
	C_2H_5-		>98	90-98*

*în prezența a 25% DMSO

Tabelul 11.3.

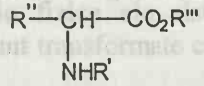
Hidroliza unor esteri ciclici cu α-chimotripsină în mediu apos

				
Exces enantiomeric (%)	42	83	86	>95
Randament (%)	73	87	90	60

α-Chimotripsina a fost utilizată în special în hidroliza stereoselectivă a esterilor unui mare număr de aminoacizi naturali și nenaturali, cu diferite structuri, cu obținerea de L-aminoacid și D-ester. pH-ul optim de acțiune și specificitatea de substrat a α-chimotripsinei o fac să fie foarte potrivită pentru rezoluția aminoacizilor aromatici (fenilalanina, triptofanul, DOPA etc.), dar enzima este utilizată și în transformarea substraturilor alifatice. Prezența unei grupări metilenice între gruparea esterică și stereocentru determină inversarea enantioselectivității enzimei, din reacție rezultând D-aminoacid și L-ester.

Tabelul 11.4.

Hidroliza enantioselectivă a esterilor aminoacizilor cu α-chimotripsină în mediu apos [Gais, 1995]



(±)

R'	R''	R'''	L-acid puritate optică (%) randament (%)	D-ester puritate optică (%) randament (%)
$-COCH_3$	$C_6H_5-CH_2-$	CH_3-	>95, 88	>95, 68
-CHO			>95, 92	-
$-COCH_3$	p-HO-$C_6H_4-CH_2-$	CH_3-	-	>95, 69
-H	o-HO-$C_6H_4-CH_2-$	C_2H_5-	>95, 75	>95, 50
	m-HO-$C_6H_4-CH_2-$		>95, 75	>95, 78
	p-HO-$C_6H_4-CH_2-$		>95, 80	>95, 78
-H	p-Cl-$C_6H_4-CH_2-$	C_2H_5-	>95, 60	>95, 40
	p-I-$C_6H_4-CH_2-$		>95, 60	>95, 60
$-COCH_3$	C_6H_5-	CH_3-	>95, 53	>95, 60
		C_2H_5-	84, 28	mare, 93
$-COCH_3$	CH_3-	C_2H_5-	>95, 91	>95, 92
	$C_2H_5OCOCH_2-$		>95, 74	>95, 83
	$C_2H_5OCO(CH_2)_2-$		>95, 60	>95, 68
	NO_2-	CH_3-	-	>95, --

Rezoluția esterilor aminoacizilor în soluții apoase, atât cu α-chimotripsină cât și cu alte enzime, prezintă o serie de dezavantaje:

• Esterii sunt instabili în soluții apoase, pierderea în puritate prin hidroliză neenzimatică necesitând precauții și fiind greu de evitat;

• În soluții concentrate de esteri, α-chimotripsina, ca și celelalte proteaze, catalizează formarea legăturilor peptidice între moleculele de aminoacizi, producând un polimer insolubil. Pentru a evita aceste reacții se blochează de obicei gruparea NH_2 prin acilare.

• Esterul D-aminoacidului nereacționat inhibă activitatea α-chimotripsinei. Ca rezultat, activitatea enzimei în soluții concentrate de DL-ester este scăzută.

• Un proces de rezoluție practic cere recircularea D-esterului nereacționat după racemizare. Racemizarea D-esterilor este dificilă în soluții apoase fără hidroliza concurentă a legăturii esterice.

Apa este un solvent nepotrivit pentru multe din reacțiile sintetice din chimia organică. Cei mulți compuși organici sunt insolubili în apă, unii dintre ei pot suferi chiar reacții de degradare în prezența acesteia, iar recuperarea produșilor de reacție din mediul apos poate fi uneori dificilă. De asemenea, o serie de reacții,

cum sunt reacțiile de hidroliză, racemizare și polimerizare sunt favorizate de prezența apei. Mult timp a existat convingerea eronată că enzimele sunt active doar în mediu apos și astfel a luat naștere ideea incompatibilității dintre sinteza enzimatică și chimia organică.

11.2.3. Reacții catalizate de proteaze în solvenți organici

Studiile ultimilor 30 de ani au infirmat ideea preconceptă cum că natura a destinat enzimele să funcționeze doar în mediu apos și că solvenții organici distrug puterea catalitică a enzimelor. Această idee simplă s-a dovedit a fi greșită. Multe enzime sau complexe multienzimatice care includ lipaze, esteraze, dehidrogenaze funcționează în medii naturale hidrofobe, de obicei în prezența sau imobilizate pe o membrană. Concentrația apei în vecinătatea acestor enzime este foarte mică. N-ar trebui să fie atunci surprinzător faptul că enzimele sunt active catalitic în sisteme de solvenți organici.

În urma studiilor de pionierat ale lui Klibanov astăzi este larg acceptată ideea că marea majoritate a enzimelor pot funcționa în solvenți organici conținând cantități mici de apă (chiar mai puțin de 0,1%, adică mediu aproape anhidru) [Klibanov, 1995]. Rapoartele de cercetare din ultimii ani se referă de cele mai multe ori la reacții enzimatice conduse în solvenți organici și nu în mediu apos.

Adăugarea solvenților organici determină scăderea polarității apei și creșterea solubilității multor compuși apolari. Scăderea conținutului de apă poate determina deplasarea echilibrului reacțiilor hidrolitice în sensul sintezei. Dezavantajele impuse de mediul apos pot fi depășite dacă reacțiile enzimatice se desfășoară în solvenți organici, și mai mult decât atât, enzimele pot prezenta o serie de proprietăți noi (modificarea selectivității, stabilitității enzimei etc.).

Reacțiile enzimatice în solvenți organici pot fi conduse în: sistem monofazic apos-organic, sistem bifazic apos-organic, sistem monofazic organic cu conținut redus de apă, sau mediu organic „anhidru" [Gais, 95, Faber, 2000, Davis, 2001, Bomarius, 2004, Preda, 2004, Peter, 2004].

Sistemul monofazic apos-organic se obține în cazul în care solventul organic este miscibil cu apa (metanol, terțbutanol, dimetilsulfoxid, dimetilformamidă, tetrahidrofuran, dioxan, acetonă etc.), iar enzima, substratul și produșii se găsesc în stare dizolvată. Solventul miscibil este utilizat în concentrație de aproximativ 10%, în puține cazuri au fost menționate concentrații de până la 50-70%. Mediul monofazic apos-organic este utilizat în reacțiile de transformare a substraturilor lipofile, sau în situația în care reacțiile biocatalitice sunt conduse la temperaturi apropiate de 0°C.

Dacă enzima este dizolvată în mediu apos, iar solventul organic este apolar și deci nemiscibil cu apa (hidrocarburi, eteri etc.), sistemul de reacție format este bifazic. În sisteme bifazice apos-organice reacția enzimatică se produce în mediul apos, iar substratul și produșii se găsesc dizolvați în faza organică. De aceea

partiţia reactanţilor şi produşilor între cele două faze şi transferul de masă al reactanţilor spre enzimă şi al produşilor dinspre enzimă trebuie să fie corespunzătoare pentru a asigura o viteză de reacţie cât mai bună. Un rol important au de asemnea şi proprietăţile fizice ale sistemelor (solubilitatea, agitarea). Substraturile puternic lipofile sunt transformate cu randamente crescute în sisteme bifazice apos-organice.

În mediile organice cu conţinut scăzut de apă (<2%) enzima se găseşte în suspensie în faza organică şi în jurul ei se găseşte o cantitate minimă de apă care îi asigură activitatea catalitică. Cercetările în acest domeniu au fost intensificate în ultimii 20 de ani, iar protocoalele de lucru sunt reproductibile, adaptabile şi uşor de realizat [Faber, 2000, Bommarius, 2004].

Desfăşurarea reacţiilor catalizate enzimatic în solvenţi organici este influenţată atât de natura solventului organic, cât şi de conţinutul de apă şi de preparatul enzimatic utilizat.

- **Natura solventului organic**

Activitatea enzimatică diferă în funcţie de solventul utilizat. Alegerea solventului potrivit pentru o activitate enzimatică maximă se face în funcţie de caracteristicile fizico-chimice ale solvenţilor, cum sunt constanta dielectrică, momentul dipol, parametrul de solubilitate Hildebrandt, dar cel mai utilizat este logaritmul coeficientului de partiţie (log P) a solventului într-un sistem bifazic 1-octanol/apă. Valorile log P pentru o serie de solvenţi sunt prezentate în tabelul 11.5 [Faber, 2000].

Tabelul 11.5.

Valorile log P pentru solvenţi uzuali

Solvent	log P	Solvent	log P
Xilitol	-5,20	n/terţ-Butanol	0,80
m-Eritrol	-4,20	Eter etilic	0,85
Glicerol	-3,00	Acetat de n/izo-propil	1,20
Etilenglicol	-1,98	Acetat de n/izo-butil	1,70
Dimetilsulfoxid	-1,30	Izopropileter	1,90
Dioxan	-1,10	Cloroform	2,00
N,N-dimetilformamidă	-1,00	Benzen	2,00
1,4-Butandiol	-0,88	Toluen	2,50
Metanol	-0,76	n/izo-Octanol	2,90
Etilenglicol-dimetileter	-0,75	Eter butilic	2,90
Acetonitril	-0,33	Tetraclorură de	3,00
Etanol	-0,24	carbon	
Acetonă	-0,23	Ciclohexan	3,20
2-Butanonă	0,28	n/izo-Hexan	3,50
Tetrahidrofuran	0,49	Eter pentilic	3,90
Acetat de etil	0,68	Eter fenilic	4,30
Piridină	0,71	n/izo-Octan	4,50
2-Metil-2-propanol	0,79	n/izo-Decan	5,60

În general, activitatea enzimatică este mai mică în solvenţi organici decât în apă. Solvenţii organici potriviţi pentru a fi utilizaţi în cataliza enzimatică, cei care inactivează cel mai puţin molecula de enzimă, sunt solvenţii hidrofobi şi care prezintă valori log P > 4. Din această categorie fac parte solvenţii nepolari, imiscibili, din clasa alcanilor, eterilor, hidrocarburilor aromatice şi haloalcanilor. Efectul inactivator cel mai puternic este prezentat de solvenţii polari cu log P < 2: metanol, acetonă, piridină, N,N-dimetilformamidă (DMF), dimetilsulfoxid (DMSO) etc. Solvenţii cu valori ale lui log P cuprins între 2 şi 4 sunt solvenţi cu polaritate moderată şi au un efect mai mare sau mai mic de inactivare a enzimei, mai greu de prezis. Dar, această corelaţie dintre efectul solvenţilor asupra enzimei şi valoarea log P este generală şi pot apărea excepţii de la regulă. De exemplu subtilizina, o enzimă cu stabilitate ridicată, este activă în solvenţi cum sunt dioxanul, tetrahidrofuranul, piridina, solvenţi în care cele mai multe enzime sunt dezactivate [Hoople, 1998, Faber, 2000].

- **Influenţa conţinutului de apă**

Majoritatea enzimelor nu funcţionează în mediu total anhidru. Dacă o pudră enzimatică "uscată" este suspendată într-un solvent organic, ea prezintă o activitate acceptabilă, dacă se respectă anumite reguli.

În general se preferă solvenţi hidrofobi (de exemplu hidrocarburile), deoarece nu extrag ultimele urme de apă, esenţiale în funcţionarea unei enzime.

Dacă se utilizează solvenţi mai hidrofili, dar imiscibili cu apa (acetatul de etil), este recomandat ca ei să fie iniţial saturaţi cu apă. Solvenţii hidrofili pot stripa ultimele urme de apă şi astfel se explică de ce în prezenţa acestora denaturarea enzimelor este mult mai pregnantă decât în prezenţa solvenţilor hidrofobi. Totuşi, unele enzime (cum sunt multe lipaze) par să lege cantitatea necesară de apă atât de tare încât funcţionează şi în solvenţi hidrofili şi în solvenţi hidrofobi [Faber, 2000, Sheldon, 1993, Bommarius, 2004].

Cantitatea de apă necesară chimotripsinei şi subtilizinei pentru a exercita funcţia catalitică în solvenţi organici este de câteva sute de molecule pentru fiecare moleculă de proteină enzimatică, mai puţin decât este nevoie pentru formarea unui monostrat apos pe suprafaţa enzimelor. Activitatea catalitică a chimotripsinei şi subtilizinei în mediu organic şi modul diferit de acţiune a acestora în solvenţi organici sunt determinate parţial de striparea urmelor de apă esenţiale pentru enzime, mai ales de către solvenţii hidrofili şi parţial de influenţa directă a solventului asupra procesului enzimatic [Bommarius, 2004].

Raportul apă-solvent organic poate influenţa foarte mult reacţia de sinteză a peptidelor. De exemplu, randamentul de obţinere a dipeptidei p-metoxibenzoiloxicarbonil–Phe-Leu-NH_2 în t-BuOH cu conţinut de 4,86% apă este cu 48% mai redus decât în cazul în care aceeaşi reacţie este condusă în mediu de t-BuOH anhidru (<0,1%) [Chen, 1992].

- **Natura preparatelor enzimatice**

O problemă importantă în biotransformările conduse în mediu organic a fost reducerea activităţii enzimatice comparativ cu activitatea în mediu apos. Pentru a minimiza impactul nefavorabil al acestei scăderi asupra proceselor

biocatalitice s-au impus o serie de cercetări, al căror rezultat a fost dezvoltarea unor strategii prin care să se obţină activităţi enzimatice apropiate în solvenţi organici şi în mediul apos.

Enzimele utilizate în medii organice se folosesc sub forma unor preparate solide-liofilizate sau imobilizate, sau sub formă solubilizată.

În mediu organic enzimele se utilizează mai ales în formă **liofilizată.** Pentru a se putea obţine o activitate optimă în mediu neapos, enzima se liofilizează din soluţie apoasă la pH optim. Se pare că enzima "îşi aminteşte" ultimul pH din soluţia apoasă la care a fost expusă [Klibanov, 1995]. Cu alte cuvinte enzima îşi păstrează starea de ionizare şi activitatea atât în stare solidă cât şi în solvenţi organici. Solventul organic imiscibil utilizat trebuie să fie saturat cu o soluţie tampon apoasă, la pH-ul optim al enzimei, înaintea adăugării acesteia.

Astfel, utilizarea chimotripsinei liofilizate în prezenţa aditivului eter 18-coroană-6 a determinat o creştere de 425 de ori a vitezei reacţiei dintre L-fenilalaninamidă şi esterul 2-cloroetilic al N-acetil-L-fenilalaninei, în mediu de acetonitril. Această accelerare este observată pentru o serie de reacţii de sinteză de peptide ce utilizează diferiţi precursori şi solvenţi ca mediu de reacţie [Bommarius, 2004].

Avnir şi colaboratorii au urmărit efectul solventului organic asupra α–chimotripsinei liofilizate în prezentă de eter 18-coroană-6 în reacţia de transesterificare a N-Ac-L-Phe-OEt cu 1-propanol (tabelul 11.6) [Avnir, 1994].

Tabelul 11.6.

Activarea α–chimotripsinei pretratate prin adiţie de eter 18-coroană-6 în cursul liofilizării

Nr. crt.	18-coroană-6 (echiv.)[a]	Spălare [b]	18-coroană-6 (mM)[c]	V_0 ($nmol.min^{-1}.mg^{-1}$)[d]	Activare [e] (%)
1	50	Nu	---	135 ± 9	100±13
2	50	Da	---	94 ± 10	70±12
3	50	Da	1	118± 9	87±12

[a] echivalenţi de eter 18-coroană-6 prezenţi în cursul liofilizării; [b] spălare cu ciclohexan/1 M 1-PrOH la a_w= 0,113; [c] concentraţia eterului coroană adăugat; [d] condiţii: 1 $mg \cdot ml^{-1}$ α–chimotripsină, 5 mM N-Ac-*L*-Phe-Oet, 1 M 1-PrOH, ciclohexan, a_w= 0,113, 30°C; [e] procentul de activare raportat la valoarea iniţială de 50 echiv. de eter 18-coroană-6. Activare definită ca V_0(18-C-6)/V_0.

Se observă că liofilizarea α–chimotripsinei în prezenţa aditivului eter 18-coroană-6 a determinat o activare enzimatică de până la 100%, în funcţie de etapele din protocolul de lucru.

Pentru a reduce fenomenele de inctivare a enzimelor care pot apărea în timpul liofilizării se utilizează o serie de lioprotectori cum sunt poliolii sau polietilenglicolul. Aceştia au rolul de a păstra nemodificată structura proteică a enzimelor în timpul deshidratării. Efecte pozitive asupra activităţii enzimatice în timpul liofilizării au şi substanţele care pot lega cavitatea hidrofobă a situsului activ

al enzimelor [Bommarius, 2004]. Liofilizarea unor proteaze în prezența sorbitolului a determinat activități enzimatice mărite, în reacția de transesterificare a esterului cloroetilic al N-acetil-L-fenilalaninei cu n-propanol în piridină anhidră (tabelul 11.7). Activarea a fost mai pregnantă pentru enzimele microbiene decât pentru α-chimotripsină [Dabulis, 1993].

Tabelul 11.7.

Activarea unor proteaze indusă de sorbitol în reacția dintre esterul cloroetilic a N-acetil-L-fenilalaninei și n-propanol piridină anhidră [Dabulis, 1993]

Enzima	Activare
Protează de *Aspergillus oryzae*	64
α-Chimotripsina	19
Subtilizina Carlsberg	45

Creșteri semnificative ale activității enzimatice în solvenți organici se obțin dacă în soluția apoasă enzimatică supusă liofilizării se adaugă săruri anorganice. Subtilizina liofilizată în prezență de KCl este de aproximativ 3750 de ori mai activă în reacția de transesterificare a esterului etilic al N-acetil-L-fenilalaninei cu n-propanol în hexan. Rezultate similare s-au obținut și pentru termolizină, ceea ce duce la concluzia că activarea enzimelor prin liofilizare în prezența KCl este general valabilă [Bedell, 1998, Bommarius, 2004].

Pentru a îmbunătăți performanțele biocatalizatorului în prezența solventului organic acesta poate fi **imobilizat**. Prin imobilizarea enzimei structura ei este stabilizată și poate fi prevenită agregarea moleculelor de enzimă, fenomen întâlnit uneori în cazul enzimelor liofilizate. Enzimele în stare imobilizată sunt utilizate predominant în reacțiile ce se desfășoară în solvenți organici cu conținut redus de apă. Alegerea atât a metodei de imobilizare cât și a suportului utilizat sunt foarte importante pentru obținerea unui preparat enzimatic corespunzător ca activitate și stabilitate operațională. Enzimele imobilizate sunt preferate în cazul aplicațiilor industriale.

α-Chimotripsina imobilizată prin adsorbție pe diferite suporturi (celită, derivați de sticle cu porozitate controlată) a fost utilizată în reacția de esterificare a N-acetilfenilalaninei cu etanol în diizopropileter. Cele mai mari activități enzimatice s-au obținut pentru suporturile cu afinitate mică pentru apă (celita). Suporturile cu afinitate mare pentru apă determină o insuficientă hidratare a enzimei. Activitatea esterolitică a α-chimotripsinei adsorbite pe sticle derivatizate cu glucoză și resturi hexil a fost maximă în diizopropileter la un conținut de 1% apă în mediul de reacție [Reslow, 1988].

Utilizarea unor serin-proteinaze imobilizate, în matrici obținute prin tehnica sol-gel, în reacția de propanoliză a esterului etilic al N-acetil-L-fenilalaninei în ciclohexan, determină accelerarea vitezei reacției comparativ cu a celei care utilizează enzimă liofilizată neimobilizată. În cazul subtilizinei și α-chimotripsinei imobilizate în matrice sol-gel se observă o creștere de 31, respectiv

43 de ori, iar în cazul tripsinei de 437 de ori. Cea mai mare activare prin imobilizare s-a observat în solvenți nepolari (ciclohexan, toluen), activarea scăzând cu creşterea polarității solventului utilizat. Acest fenomen se poate explica prin aceea că imobilizarea determină o mai bună dispersie a enzimei în matrice şi favorizează păstrarea conformației native, protejând-o de efectul denaturant al solventului [van Unen, 2001].

Termolizina şi chimotripsina au fost imobilizate prin adsorbție şi entrapare în aerogel şi s-a studiat aplicabilitatea acestora în medii organice cu conținut redus de apă, în reacția de acilare a esterului etilic al L-tirozinei cu fenilacetat de metil în toluen. Aerogelurile (geluri supuse uscării în condiții supercritice), datorită porozității lor mari, au o capacitate mare de a adsorbi apă. Rezultatele obținute au arătat că aerogelurile pe bază de silice reprezintă matrici solide potrivite pentru adsorbția şi entraparea enzimelor, utilizabile în medii organice. Aceste aerogeluri sunt suporturi higroscopice, iar capacitatea lor de adsorbție poate fi utilizată în reacții de sinteză, absența apei reducând reacțiile hidrolitice concurente (esterificarea aminoacizilor şi sinteza de peptide) [Basso, 2000].

Kawakami şi colaboratorii au obținut un preparat enzimatic imobilizat foarte activ prin entraparea unor proteaze din speciile *Aspergillus melleus* şi *Bacillus subtillis* în silicați alchilsubstituiți prin tehnica sol–gel. Activitatea enzimatică şi enantioselectivitatea acestor proteaze imobilizate a fost testată în reacția de transesterificare a glicidolului cu n-butirat de vinil în izooctan [Kawakami, 2003].

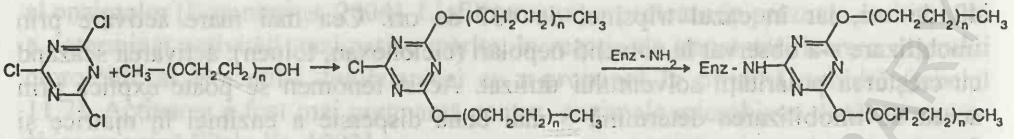
Prin imobilizarea subtilizinei, chimotripsinei şi termolizinei prin adsorbție pe silice s-a reuşit obținerea unor catalizatori capabili să funcționeze în reactor continuu în mediu organic [Fernandes, 2002].

Solubilizarea enzimelor se obține folosind o serie de surfactanți sau polimeri, prin modificarea covalentă a enzimelor cu polietilenglicol sau prin formarea de microemulsii cu enzime.

Surfactanții neionici şi cationici sunt uilizați în solubilizarea enzimelor. Un surfactant mult folosit este sarea de sodiu a dioctilsulfosuccinatului. Inconvenientul utilizării surfactanților constă în posibilitatea inactivării enzimei şi apariției unor probleme la izolarea produsului.

Solubilizarea enzimelor poate fi realizată şi cu polimeri organici. Această metodă de solubilizare permite o separare foarte uşoară a enzimei de produsul de reacție. Prezența apei în sistemul ce conține complecşi enzimă-polimer determină separarea fazelor, enzima în faza apoasă, iar produşii hidrofobi în faza organică. Etilceluloza cu chimotripsina formează un astfel de complex, solubil în toluen [Peter, 2005].

Pentru a solubiliza enzima în solvenți organici hidrofobi, ea poate fi legată covalent de polimeri solubili, cum este de exemplu polietilenglicolul (PEG). Legătura covalentă se formează între resturile lizină ale enzimei şi polietilenglicol activat. Activarea polietilenglicolului se poate realiza cu clorură de cianuril.



Polietilenglicolul creează un mediu hidrofil în jurul moleculei enzimatice, protejează astfel enzima de acţiunile dezactivante ale solventului organic şi împiedică extragerea apei esenţiale pentru activitatea enzimatică. Legarea enzimelor de PEG determină o creştere a stabilităţii şi modificarea parametrilor cinetici ai enzimei. Specificitatea de substrat poate fi de asemenea influenţată. PEG-enzimele pot fi recuperate prin precipitare cu hexan sau eter şi reutilizate.

Activitatea α-chimotripsinei modificate prin legare de PEG a fost urmărită în reacţia de hidroliză a esterului etilic al benzoiltirozinei. S-a dovedit că activitatea enzimatică a crescut direct proporţional cu lungimea lanţului macromolecular al PEG: PEG 5000 a fost mult mai eficient decât PEG 1900. În acelaşi sens a variat şi stabilitatea enzimei în timp. α-Chimotripsina modificată cu PEG a prezentat o solubilitate mai mare în cloroform şi 1,2-dicloretan decât în toluen şi 1,1,1-tricloretan (tabelul 11.8) [Ljunger, 1993].

Tabelul 11.8.

Solubilitatea α-chimotripsinei modificate cu PEG în diferiţi solvenţi

Solvent	Solubilitate (mg enzimă/ml)
Toluen	0,11
1,1,1,-tricloretan	0,15
1,2-dicloretan	>0,60
cloroform	>0,60

Microemulsiile cu enzime se formează spontan la dispersarea unui surfactant într-un solvent organic apolar, în prezenţa unei cantităţi mici de soluţie enzimatică apoasă şi sunt termodinamic stabile. În miceliile formate enzima este mai stabilă decât în mediul apos, deoarece volumul mic al acestora (de ordinul nm) împiedică mobilitatea moleculei. Enzima poate fi recuperată prin adăugarea unei soluţii apoase concentrate de săruri. Substraturile polare pot fi recuperate în acelaşi mod.

Marea problemă a miceliilor cu enzimă este prezenţa surfactantului. Acesta interferă cu recuperarea şi purificarea produselor apolare din faza organică. Pentru a elimina aceste inconveniente s-a încercat obţinerea unor microemulsii fără surfactant sau cu surfactant polimeric [Bomarius, 2004, Faber, 2000, Peter, 2005].

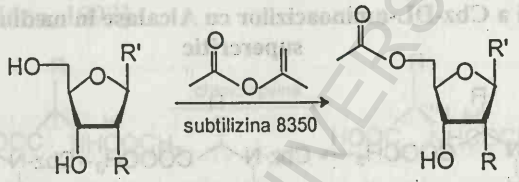
Pentru enzimele proteolitice incapsularea în micelii este benefică, deoarece moleculele de enzimă fiind separate, este limitată autoliza acestora.

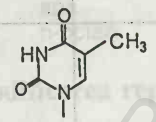
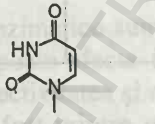
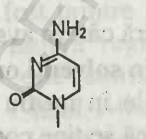
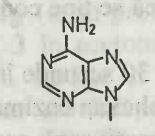
Pentru a îmbunătăţi performanţele enzimelor în solvenţi organici s-a recurs şi la metodele ingineriei genetice. S-au obţinut astfel subtilizine a căror situs catalitic activ a fost modificat prin **mutagenză direcţionată**.

Acilarea enzimatică a zaharurilor nu poate fi realizată în mediu apos, ci numai în mediu organic. Zaharurile sunt solubile doar în solvenți foarte polari cum sunt DMSO, DMF, piridina și astfel a fost nevoie de o enzimă mai stabilă în aceste medii. Prin mutagenză direcționată s-a obținut o subtilizină mult mai stabilă în DMF. Subtilizina mutantă (subtilizina 8350) obținută din subtilizină BPN' ca urmare a șase mutații specifice (Met50Phe, Gly169Ala, Asn76Asp, Gln206Cys, Tyr217Lys și Asn218Ser) este de 100 de ori mai stabilă în soluție apoasă și de 50 de ori mai stabilă în DMF anhidră decât enzima nativă, în timp ce specificitatea și proprietățile catalitice sunt similare. Ea este utilizată cu randamente foarte bune în reacții de acilare regioselectivă în DMF anhidră (tabelul 11.9) [Wong, 1990].

Tabelul 11.9.

Reacții de acilare regioselectivă catalizate de subtilizina 8350 în DMF



R	R'	Timp de reacție (zile)	Randament (%)
H		1,5	100
OH		1	80
		2	90
H		1	60
		2	80
OH		1	60
		2	80
H		1	50
		2	80
OH		1	40
		2	65
H	CH_3O-	1	70

- **Fluide supercritice**

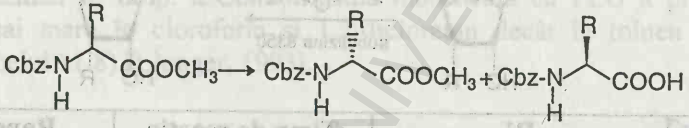
Transformarea compușilor organici lipofili poate fi realizată în solvenți organici și la fel de bine în fluide supercritice, cum este dioxidul de carbon supercritic (t_{crit}=31°C, p_{crit}=7300 kPa). Fluidele supercritice prezintă solubilitate asemănătoare hexanului, pot fi ușor îndepărtate, au toxicitate mai scăzută decât solvenții organici, vâscozitate redusă, difuzibilitate mare și pot fi utilizate în cazul

tuturor claselor de enzime. Dezavantajele prezentate de acestea sunt legate de complexitatea şi implicit costurile instalaţiilor necesare pentru asigurarea presiunii ridicate [Sheldon, 1993, Bomarius, 2004, Chen, 1994].

Alcalase este o enzimă proteolitică produsă de *Bacillus licheniformis* şi a cărei componentă majoră este subtilizina Carlsberg. Această serin-proteinază este foarte stabilă şi activă în dioxid de carbon supercritic. Ea prezintă un timp de înjumătăţire de trei ori mai mare în dioxid de carbon supercritic decât în soluţie tampon fosfat. Rezoluţia cinetică a derivaţilor aminoacizilor protejaţi la gruparea amino în mediu supercritic cu conţinut de 0,5% apă are loc cu randamente mari, iar L-aminoacizii obţinuţi prezintă purităţi optice crescute (tabelul 11.10) [Chen, 1994].

Tabelul 11.10.

Rezoluţia cinetică a Cbz-DL-aminoacizilor cu Alcalase în mediu de dioxid de carbon supercritic



Substrat (R)	Randament (%)	$ee_{L\text{-aminoacid}}$ (%)
$-CH_2-CH_3$	48	>99
$-(CH_2)_2-CH_3$	46	99
$-(CH_2)_3-CH_3$	40	99
$-(CH_2)_5-CH_3$	24	96
$-(CH_2)_3-COO-CH_3$	53	82

Cbz - benziloxicarbonil

Utilizarea enzimelor în mediul organic oferă câteva avantaje:

- **Creşterea stabilităţii enzimelor în solvenţi organici**

În general, enzimele sunt mai termostabile în mediu neapos. Stabilitatea mărită în mediu organic poate fi acceptată uşor dacă se ţine cont de faptul că multe mecanisme de dezactivare necesită apă.

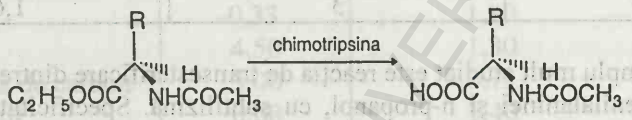
De exemplu, lizozima este inactivată după 30 secunde în mediu apos, la pH 8, sau după 100 minute, la pH 4, în timp ce în ciclohexan enzima este activă 140 de ore [Zaks, 1986]. Lipaza pancreatică (PPL) se inactivează practic instantaneu la temperatura de 100°C în apă, iar în hidrocarburi, la aceeaşi temperatură, ea are timpul de înjumătăţire de zeci de ore [Zaks, 1984].

Reacţiile de transesterificare a esterilor aminoacizilor cu alcooli, conduse în mediu organic în prezenţa chimotripsinei şi subtilizinei au dovedit o creştere a stabilităţii termice şi în timp a acestor enzime, comparativ cu stabilitatea lor în mediul apos [Zaks, 1988].

- **Modificarea specificităţii de substrat**

Apa măreşte flexibilitatea conformaţională a moleculelor de enzimă. În consecinţă, deshidratarea determină enzimele să adopte o structură mai rigidă. Deci, ele ramân pliate corespunzător în mediul organic, chiar la temperatură ridicată şi devin rezistente la denaturare. O consecinţă a rigidităţii mărite este modificarea specificităţii de substrat. Interacţiile hidrofobe reprezintă de foarte multe ori forţa motrice a legării enzimei de substrat, în mediu apos (substraturile lipofile sunt "expulzate" din apă în centrul activ al enzimei). În mediu neapos această forţă motrice nu mai există, ceea ce duce la efecte ale legării enzimei de substrat complet diferite.

De exemplu reacţia de hidroliză a esterilor L-aminoacizilor aminoacilaţi, reacţie catalizată de chimotripsină, decurge în mediu apos cu o viteză relativă de 100 de ori mai mare pentru aminoacidul fenilalanină decât pentru histidină, în timp ce în n-octan aceeaşi reacţie decurge cu viteză de aproximativ 10 ori mai mare în cazul histidinei [Sheldon, 1993].

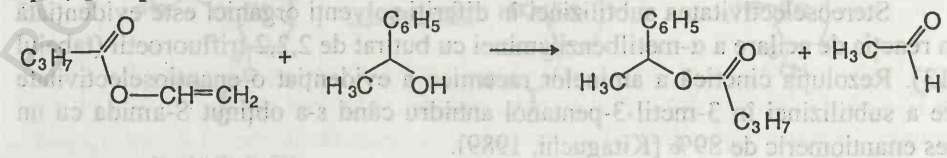


solvent	viteza relativa Phe/His
apa	>100
n-octan	<0,1

- **Modificarea regio- şi enantioselectivităţii enzimelor în solvenţi organici**

Procesele enzimatice sunt influenţate de solventul organic utilizat. Natura soventului organic poate afecta foarte mult specificitatea de substrat, activitatea, stabilitatea, regioselectivitatea şi stereoselectivitatea enzimei.

Klibanov a fost printre primii care a observat că natura solventului are o influenţă marcantă asupra regio- şi enantioselectivităţii proceselor enzimatice. Această observaţie este confirmată de raportul enantiomeric al reacţiei de transesterificare a 1-fenil-1-hidroxietanului cu butirat de vinil catalizată de subtilizina Carlsberg (serin-proteinază produsă de *Bacillus licheniformis*), raport care variază de la 3 în acetonitril la 61 în dioxan. Folosind aceeaşi reacţie de transesterificare s-a studiat şi comportarea subtilizinei BPN' (serin-proteinază produsă de *Bacillus amyloliquefaciens*). Ca şi în cazul subtilizinei Carlsberg, enantioselectivitatea subtilizinei BPN' este influenţată de natura solventului organic şi depinde de caracteristicile acestuia (constanta dielectrică, momentul dipol) [Fitzpatrick, 1991].



Tabelul 11.11.

Enantioselectivitatea subtilizinei Carlsberg şi subtilizinei BPN' în reacția de transesterificare a 1-fenil-1-hidroxietanului cu butirat de vinil, în diferiți solvenți organici anhidri [Fitzpatrick, 1991]

Solvent	Subtilizina Carlsberg	Subtilizina BPN'
	enantioselectivitate $(k_{cat}/K_M)_S/(k_{cat}/K_M)_R$	enantioselectivitate $(k_{cat}/K_M)_S/(k_{cat}/K_M)_R$
Dioxan	61	7,0
Benzen	54	6,9
Trietilamină	48	-
Tetrahidrofuran	40	5,3
Piridină	31	-
Dimetilformamidă	9	-
Nitrometan	5	1,8
N-metilacetamidă	3	-
Acetonitril	3	1,6

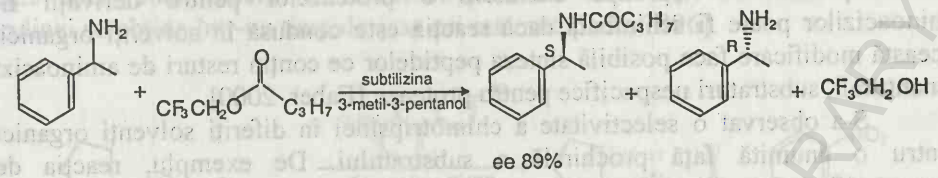
Un exemplu mult studiat este reacția de transesterificare dintre esterul etilic al N-acetil–L–fenilalaninei şi n-propanol, cu subtilizină. Specificitatea relativă a enzimei față de esterului etilic al N-acetil–L–fenilalaninei, hidrofob şi analogul sau mai hidrofil, esterul etilic al N–acetil–L–serinei, variază în funcție de tipul solventului utilizat (tabelul 11.12). Specificitatea diferită a subtilizinei pentru cele două substraturi în solvenți diferiți se datorează probabil partiției diferite a substraturilor între solventul organic şi situsul activ al enzimei [Wescott, 1993].

Tabelul 11.12.

Specificitatea de substrat $(k_{cat}/K_M)_{Ser}/(k_{cat}/K_M)_{Phe}$ a subtilizinei în reacția de transesterificare a N-Ac-L-aminoacid-OEt cu n-PrOH, în diferiți solvenți organici [Wescott, 1993]

Solvent	$(k_{cat}/K_M)_{Ser}/(k_{cat}/K_M)_{Phe}$	Solvent	$(k_{cat}/K_M)_{Ser}/(k_{cat}/K_M)_{Phe}$
Diclormetan	8,2	Acetat de etil	2,6
Cloroform	5,5	Octan	2,5
Toluen	4,8	Acetonitril	1,7
Benzen	4,4	Dioxan	1,2
Acetat de t-butil	3,7	Piridină	0,53
Tetraclorură de carbon	3,2	Alcool terțamilic	0,27
		Alcool terțbutilic	0,19
		Terțbutilamină	0,12

Stereoselectivitatea subtilizinei în diferiți solvenți organici este evidențiată şi în reacția de acilare a α-metilbenzilaminei cu butirat de 2,2,2-trifluoroetil (tabelul 11.13). Rezoluția cinetică a aminelor racemice a evidențiat o enantioselectivitate mare a subtilizinei în 3-metil-3-pentanol anhidru când s-a obținut S-amida cu un exces enantiomeric de 89% [Kitaguchi, 1989].



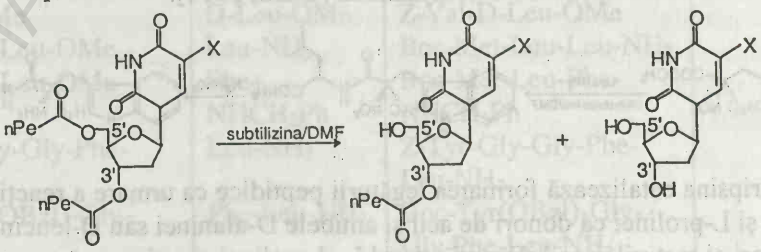
Tabel 11.13.

Enantioselectivitatea subtilizinei în acilarea α-metilbenzilaminei în diferiți solvenți [Kitaguchi, 1989]

Solvent	log P	Viteza inițială de reacție mM/h	
		S-amină	R-amină
Toluen	2,50	0,38	0,40
Ciclohexan	3,20	1,10	0,87
Acetonitril	-0,33	1,80	1,40
Octan	4,50	1,30	0,90
Tetraclorură de carbon	3,00	0,71	0,46
Acetat de etil	0,68	1,40	0,88
Piridină	0,71	8,30	3,30
N,N-dimetilformamidă	-1,00	0,66	0,23
Tetrahidrofuran	0,49	2,60	0,75
Alcool terțamilic	1,30	4,50	1,10
3-Metil-3-pentanol	1,80	23,0	3,00

Din tabelul 11.13 se observă că nu se poate stabili o corelație între valorile log P ale solvenților și selectivitatea prezentată de enzimă. Aceasta se explică printr-o insuficientă înțelegere a mecanismelor prin care solvenții organici influențează selectivitatea enzimelor.

Hidroliza regioselectivă a 2'-deoxi-3',5'-di-O-hexanoilpirimidin nucleozidului cu subtilizină în mediu de dimetilformamidă (DMF) s-a dovedit că are loc cu preponderență la atomul de carbon 5', în timp ce lipaza produsă de *Pseudomonas fluoroscens* favorizează hidroliza esterului la carbonul 3'. Nici reacția catalizată de subtilizină, nici cea catalizată de lipază nu au fost total regioselective. 3',5'-Diolul rezultat ca urmare a hidrolizei ambelor grupări esterice se găsește în procent mare în mediul de reacție [Uemura, 1989].

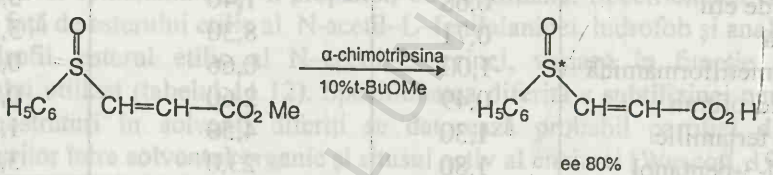


Specificitatea aproape exclusivă a proteazelor pentru derivații L-aminoacizilor poate fi schimbată dacă reacția este condusă în solvenți organici. Această modificare face posibilă sinteza peptidelor ce conțin resturi de aminoacizi nenanturali, substraturi nespecifice pentru proteaze [Faber, 2000].

S-a observat o selectivitate a chimotripsinei în diferiți solvenți organici pentru o anumită față prochirală a substratului. De exemplu, reacția de transesterificare cu chimotripsină înrețelată este selectivă pentru donori de R-acil de tipul $C_6H_5CH(CH_2OH)COOCH_3$ dacă se desfășoară în acetonă și selectivă pentru cei de tip S dacă este condusă în ciclohexan [Davis, Boyer, 2001].

De asemenea s-a observat că specificitatea chimotripsinei față de inhibitorii competitivi este opusă în octan față de cea prezentată în mediul apos [Bommarius, 2004].

α-Chimotripsina a fost utilizată și la sinteza unor sulfoxizi optic activi prin rezoluția cinetică a esterului metilic al acidului Z-3-fenilsulfinilpropenoic. Enantioselectivitatea prezentată de α-chimotripsină este superioară lipazelor testate. Pentru o creștere suplimentară a enantioselctivității reacției se pot utiliza cosolvenți de tipul dimetilsulfoxid, terțbutanol sau terțbutilmetileter [Cardellicchio, 1994].

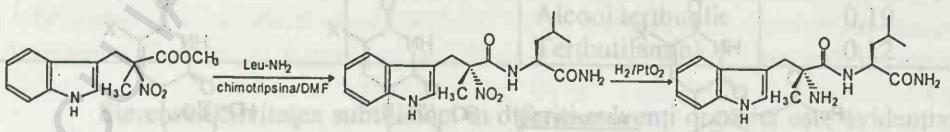


- **Modificarea echilibrului reacției în solvenți organici**

Un alt avantaj foarte important al utilizării enzimelor în mediu neapos este faptul că permite desfășurarea unor reacții care în apă nu au loc datorită echilibrelor termodinamice nefavorabile. Reacțiile de esterificare, transesterificare sau reacțiile de sinteză a amidelor, peptidelor, catalizate de proteaze și alte hidrolaze se desfășoară în prezența solvenților organici.

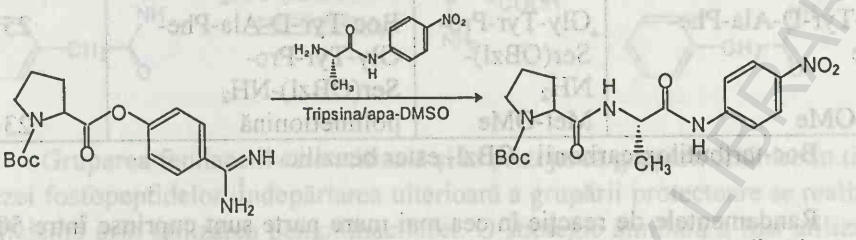
Sinteze de amide

α-Chimotripsina catalizează aminoliza enantioselectivă a 3-(3-indolil)-2-metil-2-nitropropionatului de butil cu L-leucinamida în mediu apos-organic ce conține 50% DMF. Prin hidrogenarea catalitică a produsului obținut se formează dipeptida α-metil-D-triptofanil-L-leucinamida [Chen, 1994].



Tripsina catalizează formarea legăturii peptidice ca urmare a reacției dintre esterii D- și L-prolinei ca donori de acil și amidele D-alaninei sau D-leucinei cu rol de acceptori ai resturilor acil. Enantiomerul L al prolinei reacționează cu viteză mai

mare decât enantiomerul D, astfel că produsul de reacție cu enantiomerul L-prolinei se obține într-un timp de șase ori mai mic [Itoh, 1996].



Sistemul subtilizină (EC 3.4.21.14)–dodecilsulfat de sodiu în etanol catalizează sinteza legăturii peptidice, de exemplu între Z-Ala-Ala-Leu-OMe și H-Phe-p-nitroanilidă cu randamente de 80%. Subtilizina imobilizată a fost folosită în acilarea aminoalcoolilor (ex. $H_2NCH(CH_2C_6H_5)$-CH_2OH) și a esterilor metilici ai peptidelor (ex. Z-Ala-Ala-OMe) cu randamente cuprinse între 37-77% [Roberts, 1999].

Subtilizina 8350 (mutant mai stabil în DMF al subtilizinei BPN') în mediu apos ce conține 0-50% solvent organic (DMF) catalizează sinteza lanțului peptidic pornind de la esterul metilic al metioninei. Lungimea polimerului depinde de concentrația DMF în mediu. Pentru o concentrație de 50% DMF, lanțul peptidic analizat prin ^{1}H-RMN și cromatografie de excludere moleculară conține mai mult de 50 resturi de metionină. În aceste condiții activitatea amidazică a subtilizinei este mult redusă în timp ce activitatea esterolitică este semnificativă.

Activitatea aminolitică a subtilizinei 8350 în DMF 50% este utilizată în sinteza controlată cinetic a numeroase di- și oligopeptide. Ca nucleofili se folosesc diferite amine, derivați ai D- și L-aminoacizilor sau peptidelor (tabelul 11.14) [Wong, 1990].

Tabelul 11.14.

Utilizarea subtilizinei 8350 în sinteza peptidelor

Donor de acil	Nucleofil	Produs	Randament (%)
Z-Tyr-OMe	D-Arg-OMe	Z-Tyr-D-Arg-OMe	70
Z-Leu-OMe	Ala-NH_2	Z-Leu-Ala-NH_2	59
Boc-Leu-OMe	Phe-NH_2	Boc-Leu-Phe-NH_2	46
Boc-Leu-OMe	Leu-NH_2	Boc-Leu-Leu-NH_2	48
Z-Val-OMe	D-Leu-OMe	Z-Val-D-Leu-OMe	52
Boc-Met-Leu-OMe	Leu-NH_2	Boc-Met-Leu-Leu-NH_2	68
Boc-Met-Leu-OMe	Phe-$NHCH_2Ph$	Boc-Met-Leu-Phe-$NHCH_2Ph$	95
Z-Tyr-Gly-Gly-Phe-OMe	Leu-NH_2	Z-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH_2	57
Boc-Tyr(OBzl)-Gly-Gly-OEt	Phe-Leu-NH_2	Boc-Tyr(OBzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-NH_2	83

Boc-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-OEt	Tyr-Pro-Ser(OBzl)-NH_2	Boc-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser(OBzl)-NH_2	80
Boc-Tyr-D-Ala-Phe-OMe	Gly-Tyr-Pro-Ser(OBzl)-NH_2	Boc-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser(OBzl)-NH_2	25
Met-OMe	Met-OMe	polimetionină	23

Boc-terţbutiloxicarbonil , OBzl- ester benzilic

Randamentele de reacţie în cea mai mare parte sunt cuprinse între 50% şi 95%, iar timpul de reacţie este relativ scurt (10-60 minute). Multe din peptidele obţinute sunt compuşi activi biologic [Wong, 1990].

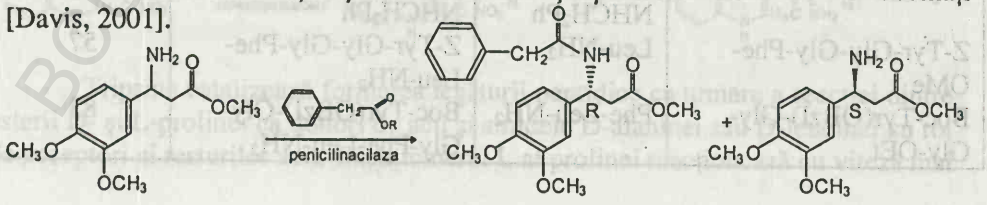
Papaina (EC 3.4.22.2) s-a dovedit a fi un catalizator foarte bun în reacţia de formare a unei legături amidice între alanina protejată la gruparea amino (Boc) şi 2-aminoetanol. Echilibrul reacţiei a fost deplasat în defavoarea hidrolizei prin utilizarea diclormetanului ca solvent, cu un conţinut redus de apă. Produsul de reacţie, Boc-alaninetanolamida, s-a obţinut cun randament de 78% [Cantacuzene, 1989].

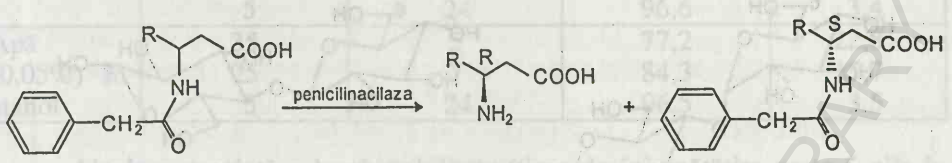
Aminoacilaza şi penicilinacilaza, deşi nu sunt proteaze tipice (EC 3.5. şi nu EC 3.4. precum proteazele prezentate anterior), au de asemenea activitate amidazică.

Aminoacilazele (EC 3.5.1.14) catalizează reacţiile de hidroliză a derivaţilor N-acilaţi ai aminoacizilor, grupările acil potrivite fiind de tipul acetil, cloroacetil sau propionil. Enzimele din această clasă sunt extrase din rinichi de porc sau sunt secretate de tulpini de *Aspergillus* sau *Penicillium*.

Aminoacilaza a fost utilizată în acilarea enantioselectivă unor α-aminoacizi (metionină, alanină, leucină, serină, valină), în acetat de etil, folosind ca donor de acil acetatul de sodiu. Produşii de reacţie s-au obţinut cu randamente bune şi cu puritate optică de 100% [Hoople, 1998]. Reacţiile de hidroliză a N-acetil-L-valinei şi N-acetil-L-metioninei au fost inhibate de prezenţa solventului organic, în timp ce echilibrul termodinamic a fost deplasat în sensul reacţiei inverse, de acilare a aminoacizilor. S-au utilizat diverşi solvenţi (glicerol, etilenglicol, 1,4-butandiol, etanol, izopropanol) în diferite concentraţii (cuprinse între 0,5M şi 9M). Cea mai bună activitate în sinteza enzimatică a N-acetil-L-valinei s-a obţinut în cazul 1,4-butandiolului 2M (log P 0,88, activitatea apei 0,8) [Manjon, 1992] [Iborra, 1992].

Penicilinacilaza (3.5.1.11) prezintă selectivitate pentru gruparea fenilacetil ceea ce a permis, mai recent, utilizarea ei în reacţii de protejare a grupării aminice şi îndepărtarea acestei grupări din amidele funcţionalizate. Aceste transformări au fost utilizate în rezoluţia β-aminoesterilor şi β-aminoacizilor N-fenilacetilaţi [Davis, 2001].



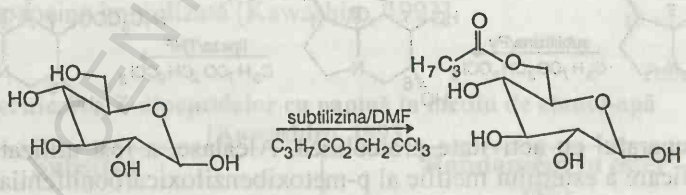


Gruparea fenilacetil este utilizată şi în protejarea grupării aminice în timpul sintezei fosfopeptidelor. Îndepărtarea ulterioară a grupării protectoare se realizează cu eficienţă prin utilizarea penicilinacilazei. O strategie similară a fost utilizată în obţinerea nucleotidelor complexe şi a nucleopeptidelor [Davis, 2001].

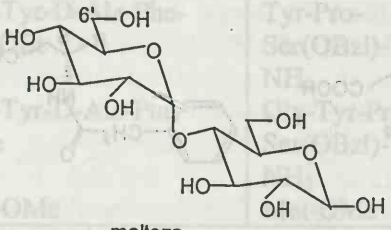
Sinteze de esteri

Subtilizina, pe lângă activitatea sa hidrolitică, în mediu de solvent organic anhidru prezintă şi activitate esterolitică. De exemplu, ea a fost utilizată în esterificarea regioselectivă a carbohidraţilor, cum sunt mono- şi dizaharidele. Utilizarea subtilizinelor în acilarea regioselectivă a carbohidraţilor este o consecinţă a solubilităţii reduse şi respectiv a activităţii acceptabile a acesteia în solvenţii organici, mai ales în cei polari cum sunt DMF şi piridina, deşi cele mai multe enzime hidrolitice sunt inactive în prezenţa acestora. Stabilitatea subtilizinelor fiind totuşi limitată, s-au obţinut prin metodele geneticii moleculare o serie de variante mutante cu stabilitate crescută la DMF [Wong, 1995].

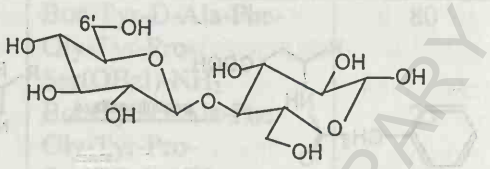
Astfel, 6-O-butirilglucoza a fost obţinută prin acilarea glucozei cu butirat de 2,2,2,-tricloroetil folosind subtilizină în mediu de dimetilformamidă anhidră. Reacţia a decurs la gruparea hidroxil primară, cu randament de 60%.



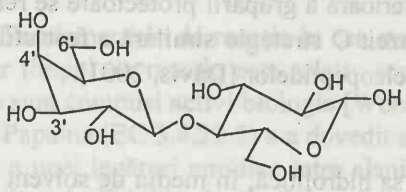
Maltoza, celobioza, lactoza şi zaharoza au fost esterificate regioselectiv cu subtilizină în mediu organic (DMF). În cazul maltozei şi celobiozei esterificarea s-a produs excusiv la gruparea hidroxil legată la atomul de carbon din poziţia 6'. Lactoza, pe lângă esterificarea grupării OH din poziţia 6' a fost acilată şi la grupările OH de la atomii de carbon 3' şi 4'. Zaharoza, care prezintă trei grupări OH primare, a reacţionat exclusiv la gruparea OH din poziţia 1' a restului de fructoză, în timp ce în acilarea chimică cele mai reactive sunt grupările OH din poziţiile 6 şi respectiv 6' [Riva, 1988, Phythian, 1998].



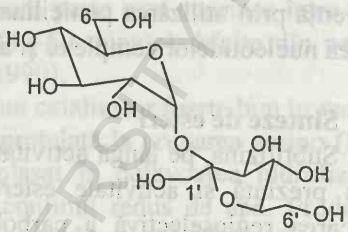
maltoza



celobioza

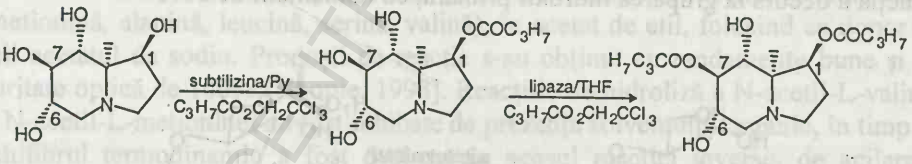


lactoza



zaharoza

Subtilizina este utilizată şi în acilarea regioselectivă a unor azazaharuri. Castanospermina este un alcaloid vegetal cu acțiune puternic inhibitoare asupra glucozidazei şi este utilizată ca agent antineoplazic şi în tratamentul SIDA. Se cunosc însă o serie de derivați O-acilați corespunzători cu acțiuni mai puternice, obținuți prin biotransformarea acestui azazaharid. Castanospermina prezintă patru grupări hidroxil secundare şi în prezența subtilizinei, utilizând piridină ca solvent, este acilată selectiv la gruparea OH de la carbonul din poziția 1 şi cu lipază în THF la OH-ul de la carbonul din poziția 7 [Faber, 2000].



Preparatul cu activitate proteolitică, Alcalase, a fost utilizat în reacția de transesterificare a esterului metilic al p-metoxibenziloxicarbonilfenilalaninei (Moz-Phe-OMe) în etanol. Rezultatele dovedesc că esterului etilic al p-metoxibenziloxicarbonilfenilalaninei se obține cu randamente mult mai bune decât produsul de hidroliză (tabel 11.15) [Chen, 1994].

Tabelul 11.15.

Randamentele de obținere a Moz-Phe-OH şi Moz-Phe-OEt în reacția de transformare a Moz-Phe-OMe catalizată de Alcalase în etanol

Solvent	Temperatura (°C)	Timp de reacție (ore)	Moz-Phe-OEt (%)	Moz-Phe-OH (%)
Etanol	43	4	78,1	21,9
	35	5	85,5	15,5
	25	7	91,0	9,0

	5	24	96,6	3,4
Apă	35	5	77,2	22,8
(0,05%) în	25	7	84,3	15,7
etanol	5	24	96,5	3,5

Alcalase prezintă o bună stabilitate (timp de înjumătăţire peste 5 zile în etanol sau terţ-butanol) şi activitate în mediu de alcool anhidru (exceptând metanolul) şi poate fi utilizată în diferite aplicaţii (reacţia de sinteză a peptidelor controlată cinetic) [Chen, 1992, Chen, 1993]. Randamentul de obţinere a esterului Moz-Phe-OEt în etanol anhidru şi în prezenţa unor cantităţi mici de apă creşte cu scăderea temperaturii [Chen, 1994].

Papaina (3.4.22.2), tiol-proteinază extrasă din Carica papaya, este o enzimă accesibilă comercial, ieftină şi cu specificitate largă de substrat. Ea catalizează reacţii de hidroliză de esteri, amide, peptide, dar şi reacţii sintetice de esterificare, transesterificare, amidare, peptidare.

Papaina este mult utilizată în reacţii de hidroliză enantioselectivă a esterilor aminoacizilor N-protejaţi, dar ea catalizează şi reacţia inversă de esterificare în mediu organic. Papaina imobilizată a fost folosită în esterificarea aminoacizilor protejaţi la azot cu randamente de 17-83%. Ca nucleofili s-au utilizat alcoolii metilic, etilic, propilic, izopropilic, butilic, benzilic, iar ca grupări protectoare Cbz, Boc, în mediu de acetat de etil [Phythian, 1998].

Esterificarea Z-dipeptidelor cu papaină în etanol cu conţinut de 2% soluţie tampon fosfat (pH 9) s-a realizat cu randamente de până la 50% (tabelul 11.16). Papaina imobilizată prin entrapare folosind Amberlite XAD-8 a fost utilizată în esterificarea Z-alaninei (Z-Ala-Ala-OH şi Z-Val-Ala-OH) în aceleaşi condiţii. Randamentele de esterificare obţinute cu papaină imobilizată au fost mai mari decât cele obţinute pentru papaina liberă. De exemplu, după 24 ore de reacţie, pentru ambele reacţii, randamentul în ester a fost de 1,5 ori mai mare în cazul în care s-a folosit papaina imobilizată [Kawashiro, 1993].

Tabelul 11.16.

Esterificarea Z-dipeptidelor cu papină în mediu de etanol-apă [Kawashiro, 1993]

Substrat	Randament în ester (%)
Z-Gly-Gly-OH	25
Z-Val-Ala-OH	51
Z-Val-Gly-OH	28
Z-Ala-Ala-OH	39

Papaina catalizează sinteza esterilor glicerinei cu aminoacizi protejaţi la azot şi cu peptide în exces de glicerol, la 40-50°C. Randamentul maxim de reacţie este cuprins între 50-70% şi a fost obţinut pentru un conţinut de 10% apă, la pH 3,2-3,4 (tabelul 11.17).

Tabelul 11.17.

Sinteza esterilor glicerinei cu aminoacizi protejaţi la azot în prezenţa papinei [Mitin, 1997]

Aminoacid	Solventul de extracţie al esterului	Randament %
Z-Ala	EtOAc	72
BOC-Asp	EtOAc	50
Boc-Cys	n-BuOH	67
Boc-Glu	EtOAc	58
Z-Gly	EtOAc	61
Z-Lys	EtOAc	53
Z-Met	EtOAc	72
Z-Phe	EtOAc	54
Z-Ser	n-BuOH	73
BOC-Ser	EtOAc	54
Z-Thr	n-BuOH	65
Z-Tyr	n-BuOH	46
Z-Phe-Ala	n-BuOH	38
Z-Val-Ala	n-BuOH	63

Esterii astfel obţinuţi pot fi utilizaţi în reacţii de sinteză a peptidelor catalizate de tripsină, dar în acelaşi timp constituie substraturi potrivite şi pentru alte enzime cu activitate esterazică [Mitin, 1997].

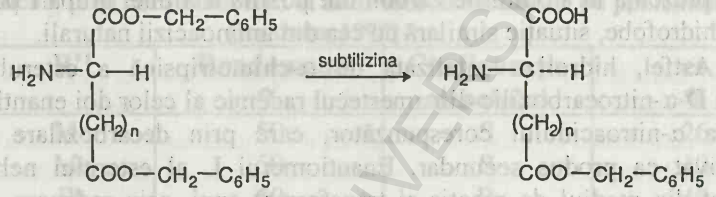
• **Realizarea transformărilor enzimatice în solvenţi organici le face compatibile cu sinteza organică.** Această compatibilitate este importantă deoarece majoritatea compuşilor organici şi bioorganici sunt insolubili sau puţin solubili în apă.

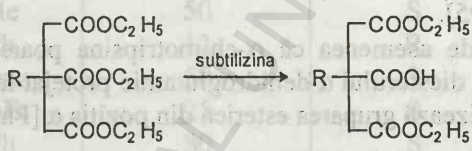
O problemă importantă în sinteza enzimatică în mediu organic este găsirea unor solvenţi în care substratul să fie solubil, dar şi activitatea enzimatică să fie la nivele corespunzătoare. Serin-proteinazele tolerează concentraţii mari de solvenţi organici hidrofili (alcooli alifatici, acetonitril, etc.). Piridina şi DMF sunt solvenţi potriviţi pentru peptidaze. În cazul metanolului şi dimetilformamidei toleranţa enzimatică este maximă la concentraţii de 50% [Bomarius, 2004].

Subtilizina este o serin-proteinază care mediază în special hidroliza peptidelor şi proteinelor. Rezoluţia cinetică a derivaţilor aminoacizilor N-protejaţi hidrofobi, insolubili în apă, este de real interes în obţinerea aminoacizilor. Majoritatea aminoacizilor nenaturali nu se pot obţine prin fermentaţie, iar rezoluţia cinetică este cea mai bună cale de obţinere a acestora sub forma enantiomerului pur. Studiile asupra stabilităţii Alcalasei în terţbutanol şi dioxan au arătat că enzima prezintă un timp de înjumătăţire de 12 ore în terţbutanol cu un conţinut de 5% soluţie tampon fosfat şi 30 minute în soluţie tampon fosfat cu 40% dioxan. Solubilitatea esterilor aminoacizilor protejaţi la gruparea amino în soluţie apoasă ce conţine dioxan este scăzută. Pentru a solubiliza complet substratul, trebuie crescută concentraţia în dioxan. O concentraţie de 25% dioxan în soluţie tampon fosfat

determină solubilizarea esterului metilic N-protejat al alaninei şi permite rezoluţia cinetică a acestuia cu Alcalase. Derivatul homofenilalaninei necesită o concentraţie de 40% în dioxan. Concentraţii mai mari decât aceasta determină deteriorarea enzimei. Alcalase s-a dovedit în schimb foarte stabilă în soluţie de terţbutanol, substraturile fiind şi ele solubile în această soluţie [Chen, 1991].

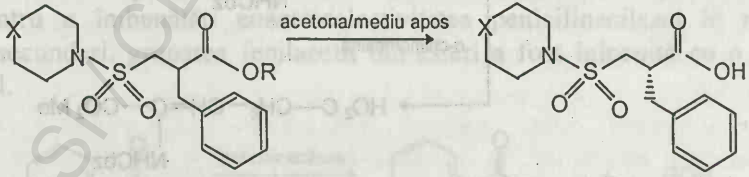
Subtilizina este un bun catalizator în reacţiile de hidroliză stereospecifică a esterilor, aşa cum s-a exemplificat anterior, dar, la fel de bine este capabilă să medieze şi reacţii de hidroliză regioselectivă. Esterii dibenzilici ai acizilor aspartic şi glutamic pot fi hidrolizaţi regioselectiv în prezenţa subtilizinei la gruparea esterică din imediata apropiere a grupării amino. Aceeaşi selectivitate se întâlneşte şi în cazul triesterului acidului 1,2,3-propantricarboxilic hidrolizat de subtilizină la gruparea esterică din poziţia centrală [Faber, 2000].





R = H, OH

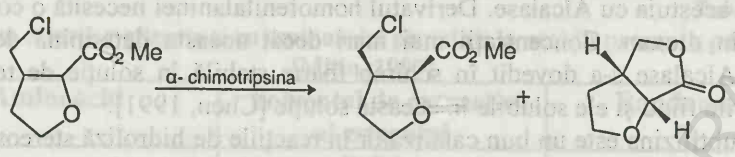
Rezoluţia esterului metilic al acidului α-benzil-β-sulfonamidopropionic se poate realiza cu subtilizină sau Alcalase, în mediu apos-organic. Din reacţie rezultă S-acidul corespunzător şi D-esterul netransformat, cu randamente cuprinse între 60 şi 90% şi exces enantiomeric mai mare de 75% [Mazdiyasni, 1993].



Peptidazele de tipul subtilizinei sunt capabile de o dublă rezoluţie cinetică, atât donorul de acil cât şi acceptorul fiind utilizaţi ca amestecuri racemice. O astfel de dublă rezoluţie enzimatică a fost realizată cu cristale de subtilizină înreţelată, naftilalanină ca donor de acil şi 1-naftiletilamină ca acceptor. Având în vedere că alcoolii terţiari şi esterii lor, în general, nu constituie substraturi pentru hidrolaze, pot fi folosiţi ca şi solvenţi organici în rezoluţia racemicilor [Faber, 2000].

α-Chimotripsina, alături de acilaza I, se utilizează în rezoluţia cinetică a amestecului racemic al esterilor de tipul 3-clorometiltetrahidrofuran-2-carboxilat

de metil. Spontan, în sistem are loc şi sinteza lactonei corespunzătoare [Davis, 2001].



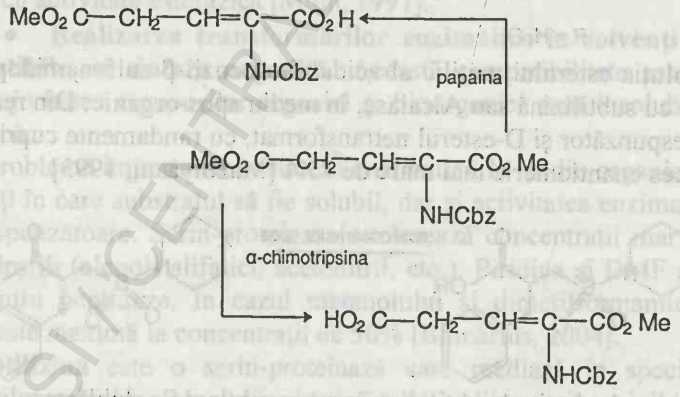
(+)-(2S, 3R) (-)-(3aR, 6aR)

randament 38% 35%
ee 86% ee 82%

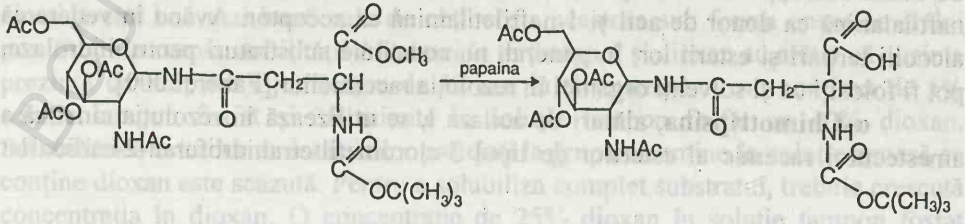
α-Chimotripsina şi papaina sunt utilizate şi în hidroliza selectivă a esterilor nenaturali. Pentru ca hidroliza catalizată de aceste enzime să fie selectivă se impune prezenţa la atomul de carbon din poziţia α a unei grupări polare şi a unei grupări hidrofobe, situaţie similară cu cea din aminoacizii naturali.

Astfel, hidroliza catalizată de α-chimotripsină a esterului metilic al acidului D-α-nitrocarboxilic din amestecul racemic al celor doi enantiomeri duce la formarea α-nitroacidului corespunzător, care prin decarboxilare formează un nitroderivat ca produs secundar. Enantiomerul L al esterului nehidrolizat este recuperat din mediul de reacţie şi transformat apoi, prin reducere, în α-metil-L-aminoacid [Wong, 1995].

S-a observat de asemenea că α-chimotripsina poate hidroliza gruparea esterică din poziţia γ a diesterului α-dehidroglutamic protejat la gruparea amino, în timp ce papaina hidrolizează gruparea esterică din poziţia α [Phythian, 1998].

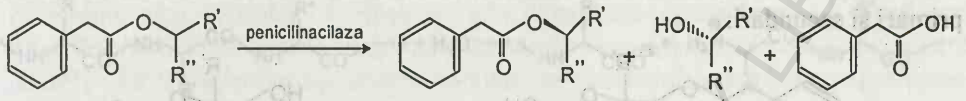


Papaina catalizează hidroliza esterilor metilici din α ai unor aminoacizi glicozilaţi şi protejaţi la gruparea amino.



De asemenea a fost observată o înaltă selectivitate a papainei în hidroliza (metoxietoxi)etil esterilor de aminoacizi (Ser, Thr) conjugaţi cu α- şi β-glicozide. Aceste reacţii decurg cu randamente de peste 75% [Eberling, 1996].

Penicilinacilaza este utilizată şi în hidroliza enantioselectivă a esterilor fenilacetici ai unor alcooli secundari, intermediari cheie în sinteza unor medicamente (tabelul 11.18).



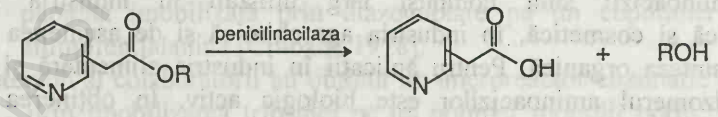
Tabelul 11.18.

Rezoluţia cinetică a esterilor fenilacetici ai unor alcooli secundari cu penicilinacilază [Baldaro, 1993]

R'	R''	Randament %	Configuraţia alcoolului	ee %
Et	Me	50	S	26
Vinil	Me	50	S	10
Me	Ph	50	R	40
Benz	Me	50	S	56
Et	Ph	12	R	94
CO_2Et	Benz	50	S	92
CO_2Et	PhEt	25	S	94
CO_2Me	Ph	50	S	90
CH_2CH_2Cl	Ph	18	R	98
CH_2CO_2Et	Ph	32	S	36

Din datele experimentale se observă că rezoluţia este eficientă doar în cazul anumitor substraturi şi depinde de configuraţia şi polaritatea substratului, enzima prezentând o specificitate mai mare decât alte enzime hidrolitice.

Pentru a îmbunătăţi enantioselectivitatea penicilinacilazei în rezoluţia alcoolilor secundari, gruparea fenilacetil din esteri a fost înlocuită cu o grupare piridilacetil.

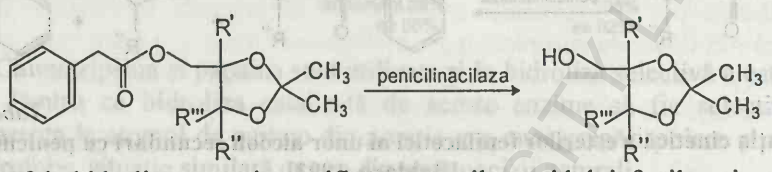


Cele mai bune conversii (40%) şi excesul enantiomeric cel mai mare (64-73%) s-au obţinut în cazul 4-piridilacetaţilor care s-au dovedit a fi substraturi mai potrivite decât 3-piridilacetaţii şi respectiv 2-piridilacetaţii.

Pentru a compara enantioselelctivitatea penicilinacilazei s-a urmărit reacţia de obţinere a R-1-feniletanolului prin hidroliza esterilor fenilacetat de feniletil şi piridilacetat de feniletil, în aceleaşi condiţii. Reacţia de hidroliză a piridilacetatului

a permis obținerea alcoolului cu exces enantiomeric de 73% la o conversie de 40%, în timp ce la hidroliza fenilacetatului excesul enantiomeric este de numai 28%. Rezultatele dovedesc că prin această metodă se poate îmbunătăți enantioselectivitatea reacțiilor catalizate de penicilinacilază [Baldaro, 1993, Phythian, 1998].

Specificitatea de substrat redusă a penicilinacilazei face posibilă catalizarea unor reacții de transformare a diferitelor substraturi, cum sunt esterii de alcooli primari și secundari.



Astfel, hidroliza enantiospecifică a esterilor acidului fenilacetic cu 2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol (asemănători structural cu penicilina G), realizată cu penicilinacilază produsă de *E.coli* și imobilizată pe perle de Eupergit, duce la rezoluția cinetică a alcoolului corespunzător cu exces enantiomeric de peste 50% [Phythian, 1998].

11.3. OBȚINERE DE AMINOACIZI OPTIC ACTIVI CU AJUTORUL ENZIMELOR

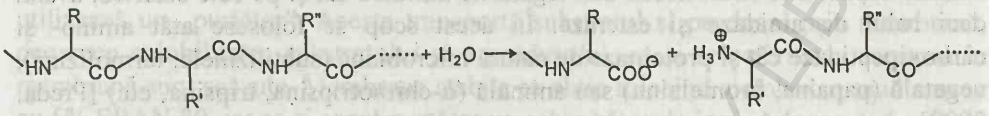
α-Aminoacizii sunt produși naturali cu funcții biologice și fiziologice importante și diverse. Cu excepția glicinei, toți α-aminoacizii au structuri chirale și majoritatea celor naturali aparțin seriei L care, în cele mai multe cazuri, corespunde configurației S după regula Cahn-Ingold-Prelog. Un efort considerabil a fost depus pentru obținerea aminoacizilor optic activi enantiomeric puri, de ambele configurații, subiect acoperit de numeroase referate de literatură [Jones, 1992, Sheldon, 1993, Williams, 1989, Faber, 2000, Bommarius, 2004, Roberts, 1995, Preda, 2000].

Aminoacizii sunt compuși larg utilizați în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică, în industria agrochimică și de asemenea ca materii prime în sinteza organică. Pentru aplicații în industria alimentară și în nutriție numai L-izomerul aminoacizilor este biologic activ. În obținerea diverselor agrochimicale sau a unor compuși organici de interes este enantiomerul D. Se cunosc multe metode chimice de sinteză a aminoacizilor, dar produșii de reacție sunt amestecuri racemice.

Biosinteza aminoacizilor cu microorganisme sau sisteme enzimatice izolate conduce în exclusivitate la L-izomerii celor 20 de aminoacizi esențiali. Din acest motiv metodele biologice sunt în general preferate, iar pentru obținerea unei

eficiențe ridicate a procesului de fabricare a aminoacizilor optic activi s-au folosit biocatalizatori imobilizați [Preda, 2000].

Sursele naturale de obținere a aminoacizilor sunt proteinele. **Hidroliza proteinelor** este o reacție des întâlnită în multe domenii ale activității umane și poate fi efectuată pe cale chimică sau pe cale enzimatică. Reacția generală de scindare a legăturii peptidice din proteine și polipeptide este:



Hidroliza chimică a proteinelor, realizată în condiții acide sau alcaline, spre deosebire de hidroliza enzimatică, prezintă o serie de dezavantaje (aminoacizii se obțin sub formă de racemizați, neutralizarea lor determină obținerea unor produse cu conținut mare de săruri, coroziunea utilajelor este ridicată, consumurile energetice sunt mari etc.). Condițiile blânde de pH și temperatură în care are loc hidroliza enzimatică a proteinelor a determinat utilizarea preferențială a acestei metode, obținându-se produse de înaltă calitate în instalații mai simple și mai puțin costisitoare.

Hidroliza enzimatică a proteinelor în condiții controlate este un proces care are loc la o valoare constantă a pH-ului, situată în domeniul neutru sau ușor alcalin, valoare menținută prin adaos continuu de alcalii. Metoda hidrolizei enzimatice controlate este în principiu aplicabilă la toate tipurile de proteine, uneori însă rezultatele obținute experimental sunt particulare pentru fiecare tip de proteină și enzimă [Zărnea, 1980].

În hidroliza limitată a proteinelor și determinarea secvenței de aminoacizi din polipeptide se utilizează enzimele proteolitice în stare liberă, dar și imobilizate prin legare de un suport solid. În acest scop s-au folosit:

- tripsina imobilizată prin diazocuplare cu un copolimer aminoacid
- pronaza din *Streptomyces griseus* legată covalent pe sticlă pororasă
- tripsina, chimotripsina și aminopeptidaza imobilizate pe CNBr-Sepharose
- leucinaminopeptidaza adsorbită fizic pe gel de fosfat de calciu
- papaina imobilizată prin diazocuplare pe un copolimer leucină-p-aminofenilalanină [Chibata, 1978].

Peterson și colaboratorii au obținut un microreactor enzimatic cu volumul de 470 nL, prin imobilizarea tripsinei pe un polimer monolit poros, localizat în capilare de silice. Acest microreactor este utilizat în digestia proteinelor într-un timp foarte scurt, mai puțin de un minut, peptidele rezultate fiind analizate prin spectrometrie de masă [Peterson, 2002]. Cercetări asemănătoare ce utilizau tripsină imobilizată pe perle de sticlă poroasă au fost realizate de Bonneil și colaboratorii [Bonneil, 2000].

O cale de obținere a aminoacizilor, cu aplicații mult mai numeroase, este **rezoluția cinetică enzimatică.**

Sintezele enzimatice de aminoacizi pot fi efectuate fie cu enzime pure, fie cu preparate celulare microbiene, animale sau vegetale, libere sau imobilizate.

Enzimele hidrolitice sunt foarte potrivite pentru rezoluția cinetică a derivaților de aminoacizi racemici, metodă care are numeroase aplicații industriale [Soda, 1987].

Sinteza enzimatică a aminoacizilor cu enzime proteolitice utilizează enzime capabile să hidrolizeze atât legăturile amidice cât și pe cele esterice, având deci rolul de amidaze și esteraze. În acest scop se folosesc atât amino- și carboxipeptidaze cât și proteinaze de natură microbiană (subtilizinele, termolizina), vegetală (papaina, bromelaina) sau animală (α-chimotripsina, tripsina, etc) [Preda, 2000].

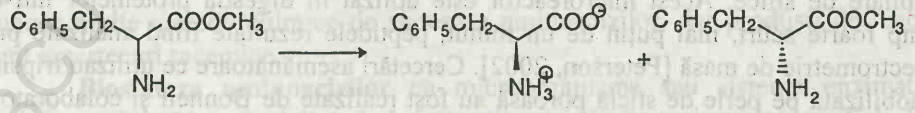
Un dezavantaj al metodei este specificitatea de substrat adesea limitată a enzimei. Deoarece majoritatea enzimelor sunt selective față de enantiomerul L, s-au căutat enzime D-selective. Astăzi enzima nu mai este o problemă deoarece, pe lângă sursele naturale, vegetale, animale și microbiene, sunt accesibile și enzime obținute în mod curent prin secvențiere, clonare și expresie. Prin mutații direcționate au devenit accesibile enzime cu proprietăți îmbunătățite, de exemplu cu termostabilitate ridicată.

Numeroase enzime au fost utilizate în rezoluția cinetică a esterilor aminoacizilor N-acilați, cea mai cunoscută și mai studiată fiind α-chimotripsina izolată din pancreasul bovin. Au fost utilizate de asemenea și alte proteaze, cum sunt subtilizina, termolizina și o serie de alte proteaze alcaline, dar în proporție mai mică. A fost menționată utilizarea în biotransformări chiar și a unor celule întregi, liofilizate, de drojdie de bere, celule cu conținut de proteaze nespecifice [Faber, 2000].

α-Chimotripsina este o serin-proteinază care catalizează hidroliza proteinelor alimentare în intestinul subțire. Este de asemenea un catalizator pentru hidroliza esterilor L-aminoacizilor sau a altor derivați ai acizilor carboxilici. α-Chimotripsina este una dintre cele mai studiate enzime hidrolitice și multe aspecte ale mecanismului său de acțiune sunt cunoscute.

Selectivitatea pentru enantiomerul L a fost utilizată în hidroliza enantioselectivă a esterilor metilici ai N-acetil-DL-triptofanului și N-acetil-DL-fenilalaninei, respectiv a esterilor etilici ai N-acetil-DL-tirozinei și N-acetil-DL-fenilalaninei substituite. În fiecare caz se produce hidroliza cu obținerea L-aminoacidului, enantiomerul D rămânând nereacționat.

Un procedeu utilizează α-chimotripsina în reacția de hidroliză a esterului metilic al DL-fenilalaninei [Preda, 2000]:



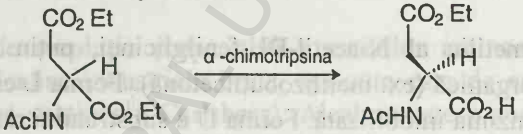
DL-Phe-OMe L-Phe D-Phe-OMe

Fixarea enzimei are loc printr-o încapsulare sub formă de emulsie a soluţiei sale apoase într-o membrană lichidă corespunzătoare. Practic, soluţia apoasă enzimatică se emulsionează în membrană şi se dispersează în soluţia hidrofilă substrat/produs.

Pentru a evita scăderea activităţii enzimatice datorită denaturării enzimei şi a inhibiţiei de substrat şi produs prin acumularea acestora în faza interioară, se utilizează un „purtător". Acesta transportă substratul şi produsul prin membrană, deoarece solubilitatea substratului şi a produsului, ca şi selectivitatea acestora în membrană sunt scăzute. Membrane stabile se obţin folosind ciclohexan sau kerosen cu 5% SPAN 80, iar ca şi agent purtător un schimbător de ioni, Adogen 464.

Varianta tehnologică a firmei Stauffer pentru obţinerea L-fenilalaninei foloseşte un sistem bifazic apă-solvent organic (apă-toluen), faza organică fiind folosită ca rezervor pentru esterul aminoacidului şi ca protecţie pentru hidroliza nespecifică, dat fiind faptul că esterii aminoacizilor sunt mai puţin solubili în apă şi solubili în solvenţi organici [Flaschel, 1987].

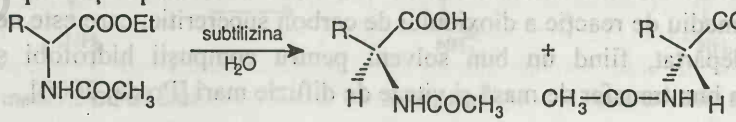
Enantio- şi regioselectivitatea enzimei sunt utilizate în rezoluţia cinetică prin hidroliza selectivă doar a unei grupări esterice dintr-un diester racemic. Astfel, α-chimotripsina catalizează hidroliza selectivă a grupării esterice din poziţia α a enantiomerului L din amestecul racemic N-acetilaspartat de dietil. Reacţia are loc cu exces enantiomeric 100% [Phythian, 1998].



ee 100%

α-Chimotripsina nu prezintă o specificitate de substrat înaltă – se pot hidroliza proteine, peptide, amide şi esteri de aminoacizi. Enzima hidrolizează un mare număr de esteri de aminoacizi acilaţi, naturali şi nenaturali. Substraturi bune sunt derivaţii de aminoacizi aromatici, inclusiv cei substituiţi pe nucleu cu halogeni şi hidroxil, dar şi cei având o catenă alifatică, funcţionalizată sau nu. Sunt tolerate în α grupările metil, alchenil şi chiar nitro [Gais, 1995]. În afara reacţiilor de hidroliză a esterilor aminoacizilor, s-au efectuat numeroase studii privind reacţiile de esterificare, transesterificare şi sinteze de peptide cu chimotripsină în medii de solvenţi organici [Preda, 2000].

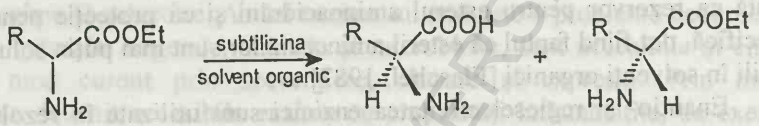
Subtilizinele, proteinaze alcaline obţinute din diferite tulpini de *Bacillus subtilis* (Carlsberg, NOVO, BPN'), au fost utilizate în hidroliza enantiospecifică (L–specifică) a esterilor de aminoacizi acilaţi în soluţii apoase, dar cu performanţe slabe. Un dezavantaj major al metodei este hidroliza neenzimatică, care conduce la scăderea purităţii optice.



ester de DL-aminoacid-N-acilat L- aminoacid-N-acilat ester de D-aminoacid-N-acilat

Gruparea amino a substratului poate fi liberă sau protejată cu o grupare funcțională, care poate fi acetil-, benzoil- sau o grupare terțbutiloxicarbonil (BOC). Protejarea grupării amino se face cu scopul de a evita posibilele reacții în care poate fi implicată aceasta. Pentru ca viteza reacției enantiospecifice de hidroliză a esterului să fie convenabilă, aceasta trebuie să implice un rest de alcool alifatic cu lanț scurt (metil, etil).

Hidroliza enantiospecifică a N-acetil-aminoacizilor esterificați catalizată de subtilizină are dezavantajul că implică o dublă derivatizare (acilare și esterificare) și de aceea, în această formă nu este convenabilă din punct de vedere comercial. În mediu organic hidroliza esterilor de aminoacizi cu subtilizină are loc cu randamente de reacție mult mai bune.



Firma Bayer a pus la punct o metodă de obținere a D-aril-glicinelor (catene laterale ale penicilinelor și cefalosporinelor de semisinteză) prin hidroliză stereospecifică cu subtilizină imobilizată în sistem bifazic apă-solvent organic [Schutt, 1985].

Esterul metilic al N-acetil-DL-fenilglicinei, puțin solubil în apă, este dizolvat în faza organică (ex. metilizobutilcetonă). Forma L este hidrolizată în faza apoasă de către enzima imobilizată. Forma D a substratului rămâne nehidrolizată în faza organică (figura 11.1).

Pentru a se atinge o puritate optică înaltă, procesul nu este condus la pH-ul optim de acțiune a enzimei, ci la pH 7, pentru a minimiza hidroliza neenzimatică a esterilor. Aminoacizii liberi se obțin din derivații lor acilați prin hidroliză acidă. Pentru a facilita îndepărtarea restului acil, se pot utiliza resturi formil, benziloxicarbonil (Z), etc.

Prin imobilizarea enzimei pe un suport polimeric, structura ei poate fi stabilizată și se poate preveni agregarea moleculelor de enzimă. Subtilizina poate fi imobilizată pe celuloză (activitate remanentă 27,2%), pe DEAE-celuloză (16,5% din activitatea inițială) sau pe poliacrilonitril (3,1% din activitatea inițială). Subtilizina imobilizată se poate utiliza în 75 de cicluri hidrolitice fără pierderea semnificativă a activității.

Deși s-au obținut randamente și purități optice mari, durata mare a proceselor nu le face încă eficiente la nivel industrial. O variantă alternativă este folosirea ca mediu de reacție a dioxidului de carbon supercritic, care este netoxic și ușor de îndepărtat, fiind un bun solvent pentru compușii hidrofobi și gaze, permițând un bun transfer de masă și viteze de difuzie mari [Preda, 2000].

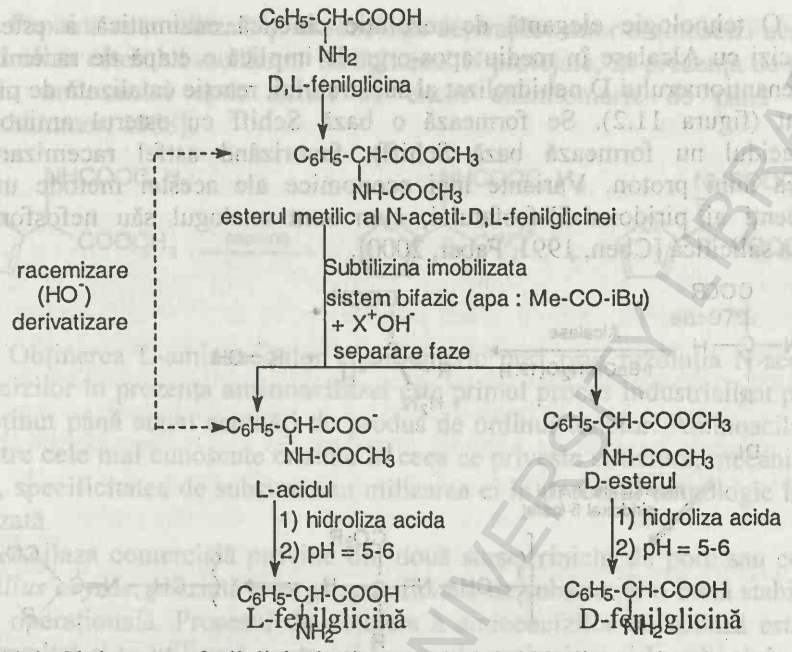


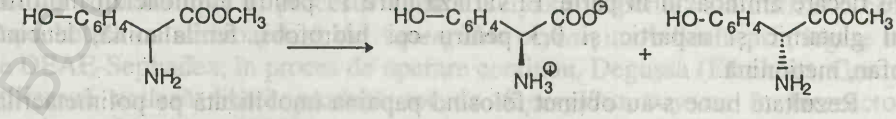
Figura 11.1. Obținerea D-fenilglicinei prin procedeul de hidroliză enzimatică cu subtilizină

O variantă de rezoluție preparativă a esterilor aminoacizilor racemici utilizează proteaze alcaline industriale brute, așa cum este de exemplu Alcalase (conținînd în principal subtilizină Carlsberg). Alcalase este o serin-proteinază cu performanțe deosebite la temperatură ridicată și alcalinitate moderată. Este produsă prin fermentație în mediu submers, dintr-o tulpină selecționată de *Bacillus licheniformis*.

Alcalase este denumirea comercială a unei proteaze industriale produse de firma Novo-Nordisk și utilizate în formularea detergenților, pentru eliminarea resturilor proteice puțin solubile și aderente la suprafața textilelor. Alcalase hidrolizează aceste proteine la peptide ușor dizolvate și dispersate de soluțiile de spălare.

Această enzimă ieftină și stabilă este utilizată cu rezultate bune în hidroliza enantioselectivă a derivaților aminoacizilor și peptidelor. Enzima hidrolizează enantioselectiv doar esterul de L-aminoacid. Produsul de reacție, L-aminoacidul liber, precipită în mediul apos-organic datorită solubilității sale scăzute. Esterul de D-aminoacid, nehidrolizat, rămâne practic cantitativ în soluție.

Sinteza aminoacizilor optic activi în general, și a L-tirozinei în particular, decurge conform următoarei reacții:



esterul metilic al DL-tirozinei — L-tirozina — esterul metilic al D-tirozinei

O tehnologie elegantă de rezoluție cinetică enzimatică a esterilor de aminoacizi cu Alcalase în mediu apos-organic implică o etapă de racemizare "in situ" a enantiomerului D nehidrolizat al substratului, reacție catalizată de piridoxal-5'-fosfat (figura 11.2). Se formează o bază Schiff cu esterul aminoacidului (aminoacidul nu formează bază Schiff), favorizând astfel racemizarea prin migrarea unui proton. Variante mai economice ale acestei metode utilizează substituenți ai piridoxal-5'-fosfatului, cum sunt analogul său nefosforilat sau aldehida salicilică [Chen, 1991, Faber, 2000].

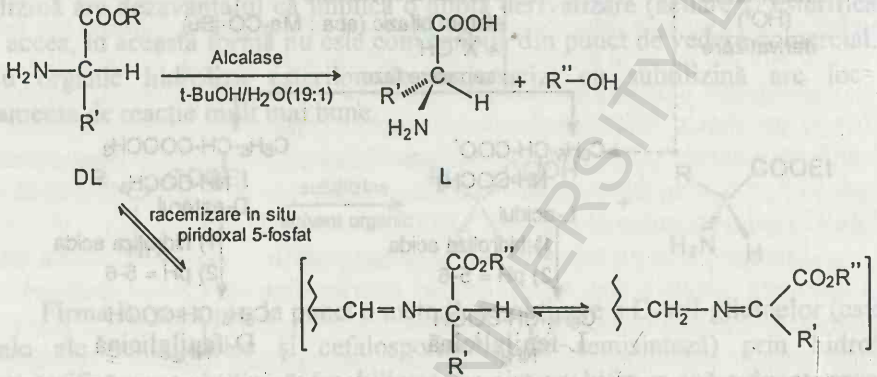


Figura 11.2. Rezoluția cinetică a esterilor de aminoacizi cu Alcalase

Papaina, tiol-proteinaza din *Carica papaya,* este o enzimă accesibilă comercial, ieftină și cu specificitate largă de substrat. Aceasta catalizează reacțiile de hidroliză a esterilor, amidelor, peptidelor, dar și reacțiile sintetice de esterificare, transesterificare, amidare, peptidare.

Papaina catalizează esterificarea stereospecifică a unui număr mare de N-terț-butiloxicarbonil-DL-aminoacizi în sistem bifazic [Williams, 1989]. Echilibrul este deplasat prin trecerea esterului format în faza organică (CH_2Cl_2):

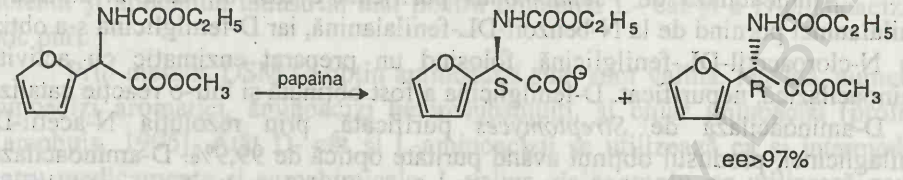
$$\text{N-BOC-Asp-OH} + C_6H_5\text{-}CH_2OH \xrightarrow[H_2O : CH_2Cl_2]{\text{papaina}} \text{BOC-Asp-O}CH_2C_6H_5 + \text{BOC-Asp-OH} + H_2O$$

În cazul acidului glutamic și acidului aspartic, este esterificată numai gruparea carboxilică din poziția α. Aminoacizii încărcați steric ca valina, izoleucina și treonina se esterifică cu randamente scăzute, iar pentru lizină, arginină și histidină nu au fost găsite condițiile optime de esterificare.

Randamentul reacției de esterificare stereospecifică depinde de raportul dintre volumul fazei apoase și fazei organice și acest raport trebuie optimizat pentru fiecare aminoacid în parte. El variază între 17 pentru aminoacizii hidrofili, acidul glutamic și aspartic și 0,3 pentru cei hidrofobi, fenilalanină, leucină, triptofan, metionină.

Rezultate bune s-au obținut folosind papaina imobilizată pe polimetacrilat de metil reticulat sau Sepharose. Papaina este una din cele mai eficiente proteinaze pentru reacțiile stereospecifice de obținere a aminoacizilor optic activi și a derivaților lor [Preda, 2000].

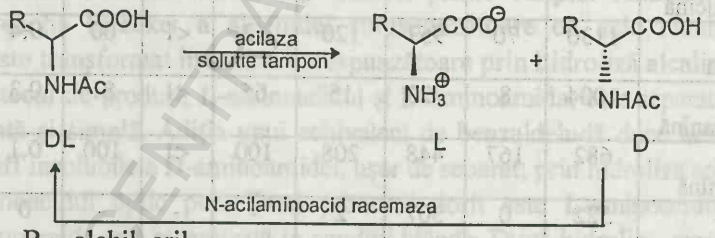
Papaina este utilizată şi în rezoluţia derivaţilor unor aminoacizi nenaturali. Prin hidroliza esterului metilic al furilglicinei N-protejate, în prezenţă de papaină, se obţin aminoacizi optic activi cu exces enantiomeric de până la 97% [Drueckhammer, 1988].



Obţinerea L-aminoacizilor enantiomeric puri prin rezoluţia N-acetil-DL-aminoacizilor în prezenţa **aminoacilazei** este primul proces industrializat prin care s-au obţinut până acum cantităţi de produs de ordinul tonelor. Aminoacilaza este una dintre cele mai cunoscute enzime în ceea ce priveşte structura, mecanismul de acţiune, specificitatea de substrat sau utilizarea ei în procesul tehnologic în formă imobilizată.

Acilaza comercială provine din două surse, rinichi de porc sau celule de *Aspergillus oryzae*, prezintă o largă specificitate de substrat şi o bună stabilitate în timp şi operaţională. Procesul de obţinere a aminoacizilor cu acilază este foarte bine dezvoltat şi se utilizează pentru obţinerea L-metioninei şi L-valinei de puritate foarte mare [Chibata, 1987, Prenosil, 1987].

Sub acţiunea aminoacilazei L-specifice se obţine L-aminoacid şi rămâne amida D-aminoacidului nereacţionată.



R = alchil, aril

Pentru eficientizarea proceselor, după separarea L-aminoacidului pe o coloană cu schimbători de ioni se realizează racemizarea "in situ" cu ajutorul unei racemaze specifice produsă de o tulpină de *Amycolatopsis,* cu randament de aproximativ 45%. Spre deosebire de cele mai multe racemaze care sunt cofactor dependente, racemaza de *Amycolatopsis* necesită pentru activare cationi de metale divalente cum sunt Co^{2+}, Mn^{2+} sau Mg^{2+} [Faber, 2000].

Iniţial rezoluţia N-acetil-DL-aminoacizilor cu aminoacilază s-a realizat cu enzimă solubilă apoi în procesul Tanabe Seiyaku (Japonia) s-a utilizat o coloană împachetată cu aminoacilază de *Aspergillus oryzae* imobilizată prin legare ionică pe DEAE-Sephadex, în proces de operare continuu. Degussa (Frankfurt, Germania) utilizează acilază liberă produsă tot de *Aspergillus oryzae,* în bioreactor tip membrană [Sheldon, 1993].

Procesul este eficientizat atât prin utilizarea eficace a enzimei cât şi prin racemizarea izomerului nedorit.

Recent au fost dezvoltate aminoacilaze D-specifice, aparținând speciilor *Pseudomonas*, *Streptomyces* și *Alcaligenes* [Bommarius, 1995]. Astfel, astăzi procesul poate fi condus atât pentru obținerea L- cât și a D-aminoacizilor cu racemizarea "in situ" a N-acetilaminoacidului nereacționat [Bommarius, 2004].

Aminoacilaza de *Pseudomonas* purificată a fost utilizată în sinteza D-fenilalaninei pornind de la N-benzoil-DL-fenilalanină, iar D-fenilglicina s-a obținut din N-cloroacetil-DL-fenilglicină, folosind un preparat enzimatic cu activitate aminoacilazică, nepurificat. D-fenilglicina a fost obținută și într-o reacție catalizată de D-aminoacilază de *Streptomyces* purificată, prin rezoluția N-acetil-DL-fenilaglicinei, produsul obținut având puritate optică de 99,9%. D-aminoacilaza a fost obținută, purificată și caracterizată și în mediul de cultură a unor tulpini de *Alcaligenes*, și anume *Alcaligenes subsp. xylosoxydans*, *Alcaligenes denitrificans* și *Alcaligenes faecalis*. Specificitatea de substrat a D-aminoacilazelor, comparativ cu L-aminoacilazele produse de tulpinile *Streptomyces* și *Alcaligenes* este redată în tabelul 11.19 [Bommarius, 1995].

Tabelul 11.19.

Specificitatea de substrat a L- și D-aminoacilazelor produse de tulpinile *Streptomyces* și *Alcaligenes*

Substrat	Activitatea relativă									
	Streptomyces tuirus		*Streptomyces olivaceus*		*Alcaligenes* DA1		*Alcaligenes* DA181		*Alcaligenes* MI-4	
	D-	L-	D-	L-	D-	L-	D-	L-	D-	L-
N-Ac-fenilglicină	100	-	100	-	3	<1	5	-	0	-
N-Ac-leucină	1130	70	957	120	52	<1	60	0,4	17	0
N-Ac-fenilalanină	1004	8	723	15	65	<1	81	0,3	80	0
N-Ac-metionină	682	167	448	208	100	<1	100	0,1	100	0
N-Ac-tirozină	522	0	307	2	-	-	-	0	-	-
N-Ac-valină	314	29	261	61	6	<1	6	0	1	0
N-Ac-triptofan	117	0	68	0	14	<1	33	0,6	5	0
N-Ac-alanină	102	38	69	92	14	<1	25	0,8	1	0
N-Ac-arginină	14	32	5	72	-	-	-	0	-	-
N-Ac-prolină	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
Acid N-Ac-glutamic	69	0	38	10	-	-	-	0	0	0
Acid N-Ac-aspartic	20	0	0	21	-	-	-	0	0	0

O altă metodă de obţinere de aminoacizi optic puri este metoda DSM (Geleen, Olanda) ce implică hidroliza enentiospecifică a amidelor de aminoacizi racemici catalizată de o **aminopeptidază L-specifică** [Sheldon, 1993].

Metoda DSM de obţinere a α-H-α-aminoacizilor chirali este o metodă eficientă şi aplicabilă industrial atât pentru obţinerea L- cât şi a D-aminoacizilor optic puri.

Prin metoda DSM se obţin aminoacizi cum sunt valina, leucina, numeroşi aminoacizi aromatici, aminoacizi heterosubstituiţi, şi chiar iminoacizi (prolina) [Kamphuis, 1995]. Atât D- cât şi L-aminoacizii se utilizează ca şi intermediari pentru medicamente şi agrochimicale. L-valina, de exemplu, se utilizează pentru fabricarea ciclosporinei, în timp ce D-valina este un intermediar cheie pentru obţinerea unui insecticid piretroid cu spectru larg de acţiune, numit Fluvalinat [Sheldon, 1993].

Pentru a fi utilizate în acest proces s-au purificat, caracterizat şi testat trei enzime: o aminopeptidază de *Pseudomonas putida*, o aminoacidamidază de *Mycobacterium neoaurum* şi o amidază de *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321. Prima dintre enzime este utilizată mai ales sub formă de celule întregi. Toate cele trei enzime catalizează transformarea amidelor de aminoacizi cu diferite structuri şi conduc la obţinerea de L-aminoacizi cu exces enantiomeric de peste 99%. Deci, enzimele prezintă o largă specificitate de substrat şi o enantiospecificitate aproape completă [Bommarius, 2004].

Substratul se obţine direct din materii prime simple. Aminonitrilul se obţine prin reacţia Strecker a aldehidei corespunzătoare cu acid cianhidric şi amoniac. El este transformat în amida corespunzătoare prin hidroliză alcalină.

Amestecul de produşi, L-aminoacidul şi D-aminoamida, este separat printr-o metodă elegantă şi simplă. Adiţia unui echivalent de benzaldehidă duce la formarea unei baze Schiff insolubile a D-aminoamidei, uşor de separat; prin hidroliza acesteia se obţine D-aminoacidul optic pur. Dacă produsul dorit este L-aminoacidul, D-N-benzilidenaminoamida este racemizată în condiţii blânde. După hidroliză, aminoamida racemică şi benzaldehida se recirculă [Faber, 2000, Sheldon, 1993, Williams, 1984].

Hidroliza fenilglicinamidei s-a făcut cu o aminopeptidază L-specifică din *Pseudomonas putida,* urmând etapele prezentate anterior.

D-fenilglicina este componentul util pentru ampicilină cu o mare cerere pe piaţa mondială. Izomerul L-, nedorit, este racemizat, esterificat la ester metilic, supus aminolizei, formând DL-fenilglicina şi apoi este reintrodus în proces (figura 11.3).

Pentru a fi substrat pentru aminopeptidaza din *Pseudomonas putida* amida aminoacidului trebuie să conţină un atom de hidrogen în α şi gruparea amino trebuie să fie liberă. Astfel pe această cale nu se pot obţine nici aminoacizii N-alchilaţi nici cei α-substituiţi. Aceasta înseamnă că α-aminoacizii α-substituiţi, o clasă valoroasă pentru aplicaţiile ei (analogi de peptide bioactive: neuropeptide, peptide chemotactice, encefaline), nu se pot obţine prin această metodă [Kamphuis, 1992].

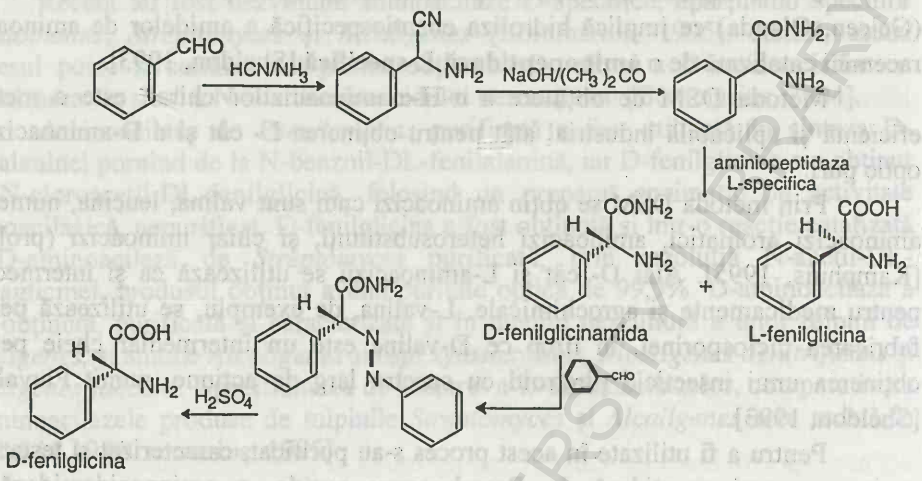


Figura 11.3. Metoda DSM de sinteză a D-fenilglicinei

Procedeul DSM este utilizat şi pentru obţinerea L-homofenilalaninei, precursor al medicamentului cu denumirea comercială Enalapril, inhibitor al convertazei de angiotensină şi folosit în tratamentul bolilor cardiovasculare (figura 11.4). Aminoamida racemică se obţine pornind de la aldehida cinamică [Sheldon, 1993].

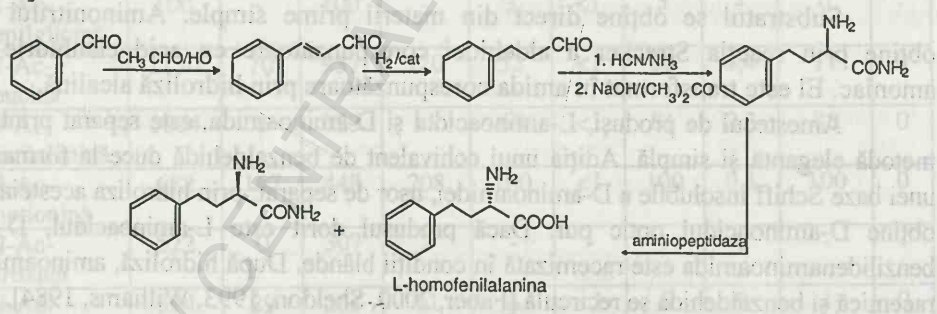
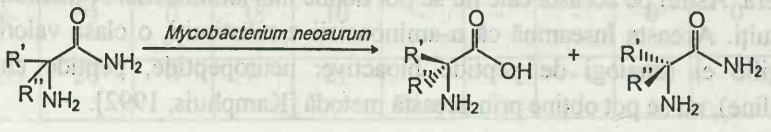
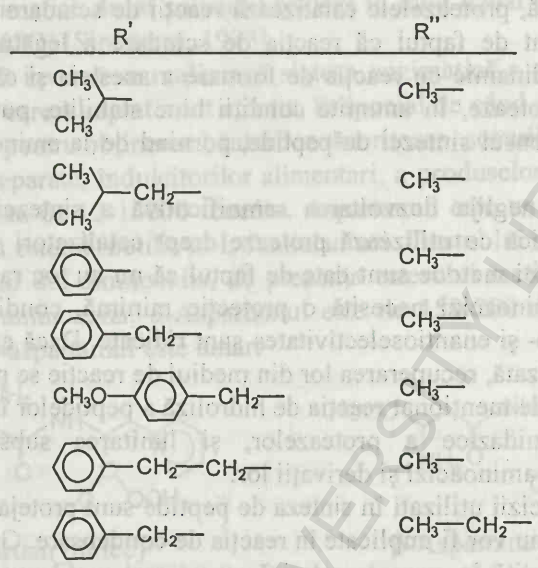


Figura 11.4. Metoda DSM de sinteză a L-homofenilalaninei

O aminopeptidază din *Mycobacterium neoaurum* este capabilă să hidrolizeze stereoselectiv un număr mare de amide de L-aminoacizi α-substituiţi. Amidele DL-aminoacizilor α-substituiţi sunt tratate cu celule de *Mycobacterium neoaurum* în apă la 37°C. Cele dou• componente obţinute, L-aminoacidul şi D-amida, se separă pe baza diferenţelor de solubilitate într-un solvent organic cum este cloroformul [Williams, 1989, Boesten, 1995].





Amidaza secretată de celulele de *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321 este L-specifică. Celulele întregi de *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321 pot cataliza transformarea unei diversităţi de substraturi, cum sunt amidele unor α-H-α-aminoacizi, α-alchil-α-aminoacizi, N-hidroxi-α-aminoacizi, α-hidroxi-α-aminoacizi. La o conversie de 50%, atât L-aminoacidul format cât şi D-amida prezintă un exces enantiomeric de >99%.

Dintr-o cultură selecţionată şi ameliorată de *Ochrobactrum anthropi* SCRC C1-38 s-a obţinut o aminopeptidază D-specifică. Enzima prezintă afinitate mai mare pentru substraturile peptidice decât pentru cele amidice. Ea a fost utilizată în hidroliza D-alaninamidei şi D-valinamidei, dar în acest ultim caz viteza reacţiei a fost mult mai mică. În formă imobilizată, aminopeptidaza D-specifică secretată de *Ochrobactrum anthropi* SCRC C1-38 a prezentat o bună activitate în mediu de solvent organic. Imobilizatul a fost studiat în reacţia de hidroliză a esterului metilic al D-alaninei în 3-aminopentan [Boesten, 1995].

11.4. SINTEZE ENZIMATICE DE PEPTIDE

Peptidele sunt macromolecule cu activitate biologică diversă şi drept urmare importanţa comercială a acestora a crescut foarte mult. Ele pot fi utilizate ca antibiotice, toxine, factori de creştere, sau îndulcitori; peptidele joacă un rol important în secreţia hormonală, având rol stimulator sau inhibitor, iar una dintre cele mai recente aplicaţii utilizează peptidele ca imunogeni pentru obţinerea de antiseruri specifice.

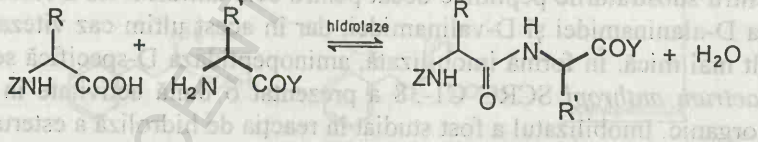
În natură, proteazelele catalizează reacții de scindare a legăturii peptidice. Dacă ținem cont de faptul că reacția de scindare a legăturii peptidice este în echilibru termodinamic cu reacția de formare a acesteia și că ambele reacții sunt catalizate de proteaze, în anumite condiții bine stabilite, putem utiliza enzimele proteolitice în sensul sintezei de peptide, pornind de la aminoacizi sau derivați ai acestora.

Fără a neglija dezvoltarea semnificativă a sintezei chimice automate, metoda enzimatică ce utilizează proteaze drept catalizatori este foarte atractivă. Avantajele acestei metode sunt date de faptul că nu au loc racemizări, moleculele reactante de aminoacizi necesită o protecție minimă, condițiile de reacție sunt blânde, iar regio- și enantioselectivitatea sunt ridicate. Dacă enzimele se utilizează în formă imobilizată, recuperarea lor din mediul de reacție se poate realiza ușor. Ca dezavantaj este de menționat reacția de hidroliză a peptidelor în formare, ca urmare a activității amidazice a proteazelor, și limitarea substraturilor enzimelor proteolitice la L-aminoacizi și derivații lor.

Aminoacizii utilizați în sinteza de peptide sunt protejați la grupările amino și carboxil care nu vor fi implicate în reacția de condensare. Gruparea carboxil este de obicei convertită în grupare esterică cu un rest metil sau benzil, iar gruparea aminică este cel mai adesea transformată în derivatul terțbutiloxicarbonilamidă (BOC).

Se cunosc trei strategii de sinteză enzimatică de peptide: hidroliza inversă, amidoliza esterilor și amidoliza amidelor (transpeptidarea) [Sinisterra, 1993, Sheldon, 1993, Faber, 2000, Bommarius, 2004].

11. 4. 1. Hidroliza inversă este un proces endergonic, controlat termodinamic, pentru deplasarea echilibrului de reacție în sensul creșterii randamentului în produs.

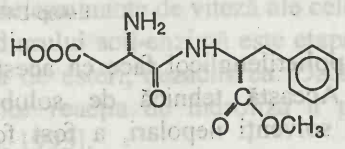


În condiții fiziologice, echilibrul reacției catalizate de proteaze este deplasat în sensul proteolizei. În mediu apos, pentru a deplasa echilibrul în sensul sintezei de peptide, este necesar ca produsul de reacție să fie continuu eliminat, prin precipitare sau extracție într-un solvent imiscibil cu apa. De obicei, utilizarea unei enzime imobilizate este nepractică dacă produsul precipită. Mai mult, utilizarea unui sistem bifazic apos – organic duce la formarea de canale preferențiale în patul fix de enzima imobilizată. Utilizarea enzimelor imobilizate se pretează în solvenți organici anhidri.

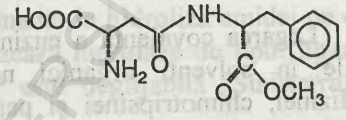
O altă metodă favorabilă sintezei de peptide presupune conducerea reacției în mediu organic cu conținut redus de apă. Adăugarea unui solvent organic miscibil cu apa duce la scăderea gradului de ionizare a componentei carboxilice și se obține astfel o creștere a concentrației de substrat. S-a observat că o serie de compuși polihidroxilici, cum sunt glicerolul, 1,4–butandiolul, au un efect protector mai bun

asupra activităţii enzimatice decât solvenţii folosiţi în mod uzual (etanol, acetonă, acetonitril, DMF, DMSO) [Sinisterra, 1993].

Prin hidroliză inversă se realizează sinteza enzimatică a aspartamului, un îndulcitor nenutritiv, care a captat mult atenţia, în special de când a fost aprobat de FDA. El este utilizat pentru obţinerea băuturilor răcoritoare, sosurilor pentru salate, mâncărurilor gata preparate, îndulcitorilor alimentari, a produselor farmaceutice şi se produce în cantitate de 12-15000 tone/an. Aspartamul este un dipeptid format din acid L-aspartic şi esterul metilic al L-fenilalaninei. Gustul lui dulce depinde de conformaţia L a celor doi aminoacizi, de prezenţa esterului metilic şi de legarea corectă a celor doi aminoacizi. α-Aspartamul este de 150-200 de ori mai dulce decât zaharoza, iar β-aspartamul este amar.



α-Aspartam (dulce)

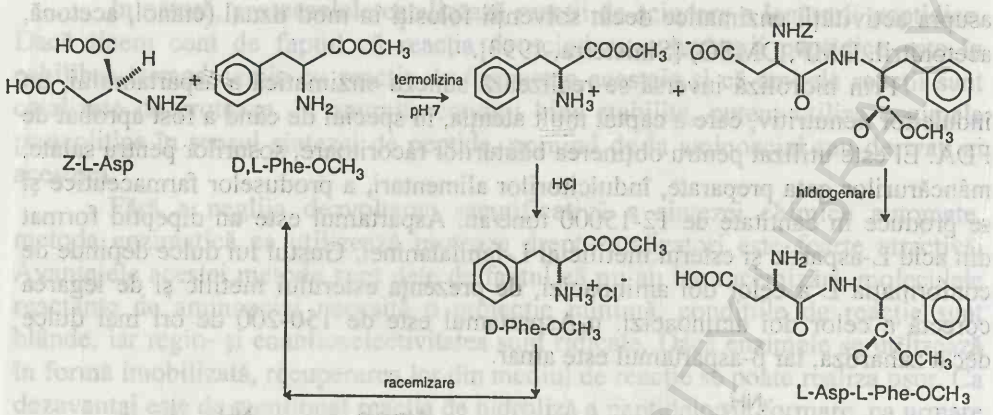


β-Aspartam (amar)

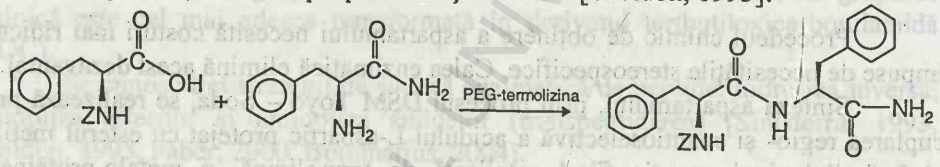
Procedeul chimic de obţinere a aspartamului necesită costuri mai ridicate impuse de necesităţile stereospecifice. Calea enzimatică elimină acest dezavantaj.

Sinteza aspartamului, prin procesul DSM Toyo – Soda, se realizează prin cuplarea regio- şi enantioselectivă a acidului L-aspartic protejat cu esterul metilic al L-fenilalaninei, reacţia fiind catalizată de termolizină, o metalo-proteinază produsă de *Bacillus thermoproteolyticus* [Poldermans, 1987]. În procesul comercial se utilizează ca şi substrat amestecul racemic al esterului metilic al fenilalaninei, care duce la formarea unei sări 1:1 între aspartamul protejat la gruparea amino şi esterul metilic al D-fenilalaninei. Sarea este puţin solubilă în apă şi precipită. Produsul este astfel îndepărtat din sistem şi echilibrul deplasat în sensul sintezei de peptide. Componenta aminică se îndepărtează prin tratare cu acid, iar gruparea protectoare (benzoiloxicarbonil) prin hidrogenare. Deşi este descris un procedeu de cuplare folosind termolizină imobilizată, în mediu de acetat de etil, se crede că procedeul comercial are loc cu enzimă solubilă, în apă [Sheldon, 1993].

Studiile asupra reacţiei de sinteză a aspartamului, reacţie catalizată de termolizină în mediu de solvent organic cu conţinut scăzut de apă (4%) au demonstrat că randamentul de obţinere a produsului este puternic influenţat de natura solventului folosit. Astfel, alcoolii alifatici, cum este de exemplu alcoolul t-amilic, determină obţinerea celor mai bune randamente în produs (peste 70%). Solvenţii polari aprotici (DMF, DMSO) nu sunt potriviţi pentru obţinerea produsului dorit (randament mult prea mic), în timp ce solvenţii cu polaritate mai redusă, cum este acetatul de etil, prezintă randamente de obţinere moderate (~40%). Rezultate similare au fost găsite şi în alte sisteme enzimatice desfăşurate în solvenţi organici [Nagayasu, 1994].



Legarea covalentă a enzimelor de polietilenglicol face ca acestea sa fie solubile în solvenți organici nepolari. Această tehnică de solubilizare a termolizinei, chimotripsinei şi papainei în solvenți nepolari, a fost folosită în sinteza de peptide. PEG-termolizina catalizează sinteza de peptide protejate în benzen, în prezență de diizopropilamină şi metanol [Sheldon, 1993].



Papaina imobilizată prin diferite metode (adsorbție pe Celită, legare ionică de CM-celuloză şi QAE-Sephadex şi înrețelare cu albumină) a fost utilizată în sinteza dipeptidei BOC-Phe-Val-OMe în acetat de etil, procesul fiind controlat termodinamic. Enzima imobilizată prin înrețelare cu albumină s-a dovedit a fi cea mai eficientă, randamentul de obținere a dipeptidei fiind de 94,5%. În aceleaşi condiții s-a realizat şi sinteza altor dipeptide, randamentele de reacție fiind mai reduse (tabelul 11.20) [Zhang, 1996].

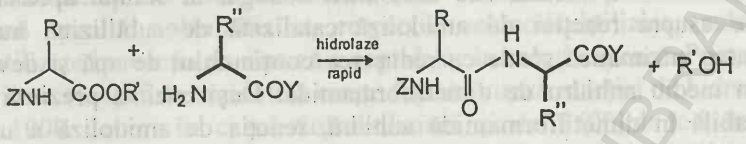
Tabelul 11.20.

Sinteza dipeptidelor cu papaină imobilizată prin înrețelare cu albumină în acetat de etil

Donor de acil	Nucleofil	Dipeptide	Randament %
Boc-Phe	ValOMe	Boc-Phe-ValOMe	94,5
Boc-Phe	LeuOMe	Boc-Phe-LeuOMe	92,3
Boc-Phe	MetOMe	Boc-Phe-MetOMe	83,5
Boc-Phe	AlaOMe	Boc-Phe-AlaOMe	76,8
Boc-Phe	PheOMe	Boc-Phe-PheOMe	42,7
Boc-Phe	TyrOMe	Boc-Phe-TyrOMe	44,5
Boc-Phe	TrpOMe	Boc-Phe-TrpOMe	34,5

11.4.2. Amidoliza esterilor, o reacție ireversibilă controlată cinetic, are loc cu viteză mai mare decât hidroliza inversă. Metoda este limitată la acele enzime

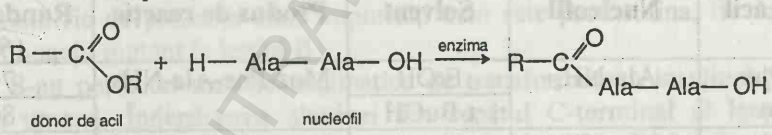
care formează un intermediar acil-enzimă (chimotripsină, tripsină, papaină, subtilizină, dar și lipaze și esteraze).



Folosind proteaze, formarea de produs (activitatea esterazică) se află în competiție cu hidroliza consecutivă (activitatea amidazică). Astfel, pentru ca randamentul să fie maxim, activitatea amidazică trebuie eliminată sau redusă foarte mult față de cea esterazică. Acest lucru este posibil în cazul proteazelor deoarece etapele determinante de viteză ale celor două procese sunt diferite. Astfel, formarea intermediarului acil-enzimă este etapa determinantă în hidroliza amidei pe când în hidroliza de esteri, dezacilarea. Dacă se utilizează hidrolaze de tipul lipazelor și esterazelor reacția de hidroliză a peptidelor este neglijabilă [Sinisterra, 1993, Sheldon, 1993].

Pentru a controla activitatea esterazică comparativ cu cea amidazică s-au efectuat studii de reacție în mediu apos la temperaturi scăzute (-25°C ~ -15°C), de utilizare de solvenți organici miscibili cu apa, modificare de pH, modificări de situs activ.

O serie de cercetări asupra reacției de amidoliză a esterilor au arătat că randamentul de obținere a peptidelor în mediu apos crește foarte mult dacă reacția este condusă la temperaturi de -25°C (tabelul 11.21) [Jakubke, 1996].



Tabelul 11.21.

Modificarea randamentului de obținere a peptidelor în funcție de temperatura de reacție

Donor de acil	Enzima	Randamentul în peptidă (%)	
		25°C	-25°C
Maleil –Tyr – OMe	α – chimotripsină	10	94
Maleil – Phe – Ala – OEtCl	papaină	42	79
Benziloxicarbonil – Glu - OMe	proteaza V8	5	76

În general, esterii metilici și etilici ai L-aminoacizilor naturali (protejați la gruparea amino) sunt suficient de reactivi și duc la viteze de reacție corespunzătoare în sinteza peptidelor. Termenii mai puțin reactivi, cum sunt esterii aminoacizilor α-substituiți sau cei cu configurație D se utilizează în formă activată (2-haloetilester, p-nitrofenilester etc) [Sheldon, 1993].

Un alt mijloc de a minimiza hidroliza față de amidoliză este operarea în sisteme cu conținut redus de apă [Sinisterra, 1993]. Serin- și tiol-proteinazele

prezintă acţiuni similare esterazelor (nu au activitate amidazică) în mediu organic cu conţinut redus de apă, când se folosesc solvenţi organici miscibili precum dimetilformamidă, dioxan sau acetonitril adăugat la soluţia apoasă de enzimă. Studiile asupra reacţiei de amidoliză catalizată de subtilizină au dovedit că activitatea enzimatică scade cu reducerea conţinutului de apă şi devine egală cu zero în mediu anhidru de dimetilformamidă. Deşi enzima prezintă o stabilitate acceptabilă în dimetilformamidă anhidră, reacţia de amidoliză a unui ester cu reactivitate redusă decurge cu viteză prea mică pentru a putea fi utilizată practic în sinteza unei peptide. În mediu cu conţinut de dimetilformamidă 50-70%, enzima este destul de stabilă şi cu o bună activitate esterolitică, în timp ce activitatea amidazică este nesemnificativă, iar randamentul de obţinere al peptidei este mare. Determinarea parametrilor cinetici (k_{cat} şi K_M) ai reacţiilor în mediu organic catalizate de chimotripsină şi subtilizină au arătat că odată cu creşterea concentraţiei solventului organic atât k_{cat} cât şi k_{cat}/K_M scad [Wong, 1995]. Chimotripsina este foarte activă în suspensie în diclormetan cu un conţinut de 0,2% apă [Sheldon, 1993].

Reacţia de sinteză a peptidelor cu Alcalase în alcooli anhidri a arătat că în timp ce enzima acceptă doar donori de acil cu configuraţia L, are o specificitate mult mai largă pentru acceptorii acil. Derivaţii multor D-aminoacizi pot fi astfel implicaţi cu succes în sinteza peptidelor (tabelul 11.22) [Chen, 1992].

Tabelul 11.22.

Reacţii de sinteză de peptide catalizate de Alcalase

Donor acil	Nucleofil	Solvent	Produs de reacţie	Randament (%)
Moz-Phe-OMe	Ala-NH_2	EtOH	Moz-Phe-Ala-NH_2	79
		t-BuOH		86
Moz-Phe-OBn	Leu-NH_2	t-BuOH	Moz-Phe-Leu-NH_2	94
	D-Leu-NH_2		Moz-Phe-D-Leu-NH_2	89
Moz-Phe-OMe	Phe-NH_2	t-BuOH	Moz-Phe-Phe-NH_2	82
	D-Phe-OMe		Moz-Phe-D-Phe-OMe	91
Z-Tyr-OMe	D-Arg-OMe	t-BuOH	Z-Tyr-D-Arg-OMe	81
Z-D-Phe-OMe	Ala-NH_2	EtOH	Z-D-Phe-Ala-NH_2	0

Moz-p-metoxibenziloxicarbonil, Bn-benzil, Z-benziloxicarbonil

Anumite concentraţii de apă-solvent organic miscibil (50-60%) pot determina inhibiţii avantajoase ale activităţii enzimatice. La aceste rapoarte de solvenţi activitatea amidazică a serin şi cistein-proteinazelor este inhibată, iar activitatea esterazică este suficient de mare pentru a cataliza formarea legăturilor peptidice prin amidoliza esterilor, prin control cinetic. Acest comportament este probabil rezultatul unor modificări conformaţionale ca urmare a interacţiei cu

mediul apos-organic şi care se reflectă în modificarea specificităţii enzimei [Barbas, 1988].

Prin înlocuirea Ser 221 din situsul activ al subtilizinei cu cisteină sau selenoilcisteină rezultă tiolsubtilizina, respectiv selenoilsubtilizina, subtilizine modificate, utilizate în reacţia de sinteză a peptidelor în soluţie apoasă. Prin această substituţie, viteza reacţiei de amidoliză creşte faţă de viteza reacţiei de hidroliză de aproximativ 1000 de ori în cazul tiolsubtilizinei şi de 1400 de ori în cazul selenoilsubtilizinei. Totuşi, eficienţa catalitică a acestor derivaţi ai subtilizinei este de 10^2–10^4 ori mai mică decât a subtilizinei native [Engels, 1995].

Introducerea unei grupări metil la azotul din poziţia ε a His din situsul activ al chimotripsinei determină de asemenea modificări importante în mecanismul catalitic al acestei enzime. Similar tiolsubtilizinei, chimotripsina metilată favorizează amidoliza în defavoarea hidrolizei peptidei formate. Amidoliza esterilor aminoacizilor N-protejaţi, catalizată de Alcalase, este intensificată în concentraţii crescute de alcooli [Wong, 1995].

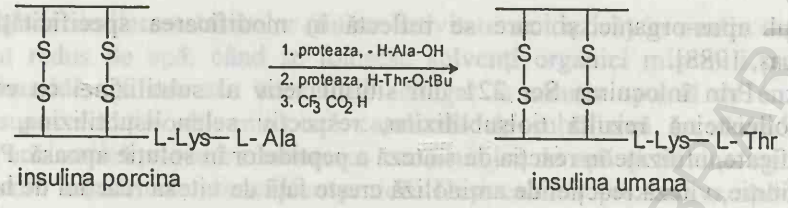
11.4.3. Transpeptidarea se utilizează industrial pentru obţinerea insulinei umane din insulină porcină şi este probabil cea mai evidentă sinteză enzimatică de peptide.

Insulina umană şi cea porcină diferă doar printr-un singur aminoacid, având la capătul C-terminal al lanţului B treonină, respectiv alanină. Pacienţii diabetici care au fost trataţi cu insulină de porc o perioadă mai lungă de timp pot sintetiza anticorpi împotriva acestui tip de insulină. Această sinteză este determinată fie de prezenţa unor impurităţi cum este proinsulina, fie de prezenţa unui aminoacid mutant în lanţul B.

S-au perfectat metode enzimatice de transformare a insulinei porcine în insulină umană. Îndepărtarea alaninei din capătul C-terminal al lanţului B al insulinei porcine se face cu carboxipeptidaza A, iar legarea ulterioară a treoninei se face în prezenţă de tripsină, folosind ca mediu de reacţie un amestec de 1,4-butandiol şi apă [Roberts, 1995]. Hidroliza capătului C-terminal al lanţului A de către carboxipeptidaza A, care este o exoprotează, poate complica prima reacţie. Gruparea carboxil a treoninei este esterificată cu o grupare terţ-butil pentru a nu se produce reacţii secundare nedorite.

În 1982 Novo (Danemarca) a produs insulină umană prin metode enzimatice. Două luni mai târziu, Eli Lilly (SUA) a obţinut insulină umană prin metodele ingineriei genetice care s-au dovedit a fi mult mai profitabile [Poldermans, 1987].

O altă cale de transformare a insulinei porcine utilizează o protează cu specificitate absolută pentru resturile de lizină din legăturile peptidice, protează obţinută din tulpini de *Achromobacter lyticus*. Aceeaşi enzimă acţionează în ambele etapele ale procesului: hidroliza restului Ala terminal şi reacţia de condensare cu treonină sub formă de ester terţbutilic. Gruparea terţbutil este apoi îndepărtată prin tratament acid [Faber, 2000].



insulina porcina — insulina umana

11.5. REACȚII CATALIZATE DE PROTEAZE ÎN SINTEZA UNOR MEDICAMENTE

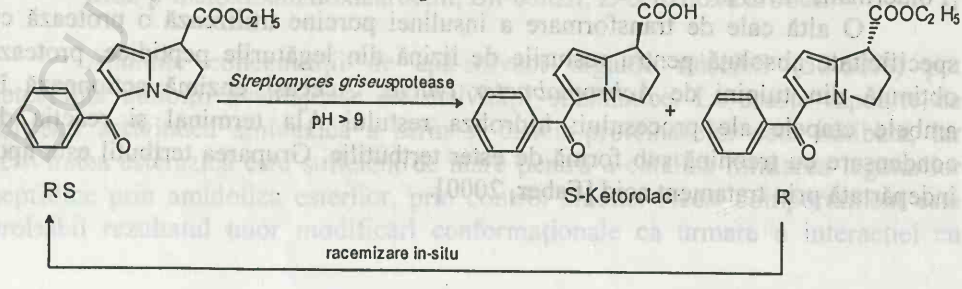
Cu fiecare an care trece enzimele sunt tot mai mult utilizate în procese biotehnologice enantioselective ce vizează obținerea de compuși utili în industria farmaceutică și medicină (obținerea de biosenzori, analize chimice).

Marea majoritate a medicamentelor prezintă unul sau mai multe centre de chiralitate, iar puritatea optică joacă un rol esențial în specificitatea și toxicitatea agentului farmacologic. Această observație a fost făcută prima dată de către Carl Pfeifer în 1956: „cu cât doza efectivă (necesară) a unui medicament este mai mică, cu atât este mai mare diferența între efectul farmacologic al izomerilor optici" [Pfeifer, 1956].

Izomerul inactiv terapeutic al unui medicament racemic (distomerul) trebuie privit ca o impuritate nedorită care este o entitate farmacologică diferită, potențial toxică. În cel mai bun caz distomerul nu are efecte secundare serioase, este doar un balast. În unele cazuri enantiomerii prezintă efecte terapeutice diferite, uneori sinergice și avantajoase. Dar, există și situații în care distomerul este toxic și are efecte secundare foarte serioase.

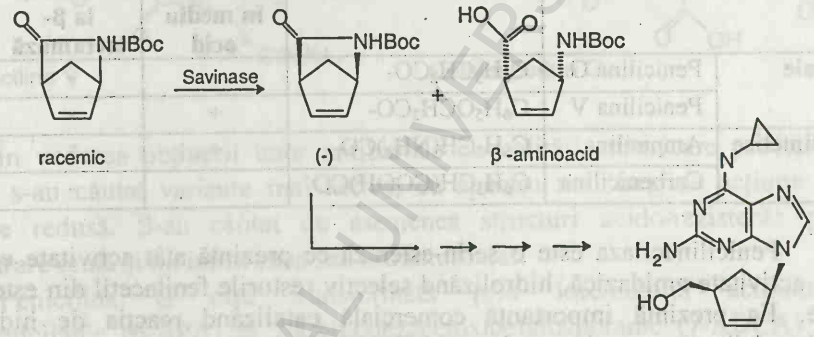
Proteazele, alături de alte enzime, își găsesc aplicabilitate în sinteza medicamentelor atât în stare liberă, cât și imobilizată, sau sub formă de celule întregi.

Reacția de hidroliză a esterilor carboxilici catalizată de proteaze este întâlnită în rezoluția cinetică a amestecului racemic a unei substanțe cu proprietăți antiinflamatoare, numită Ketorolac. Proteaza microbiană utilizată este produsă de celule de *Streptomyces griseus*. Dacă reacția este condusă la valori ale pH-ului mai mari decât 9, are loc și racemizarea in-situ și astfel randamentul teoretic al rezoluției este de 100% [Faber, 2000].

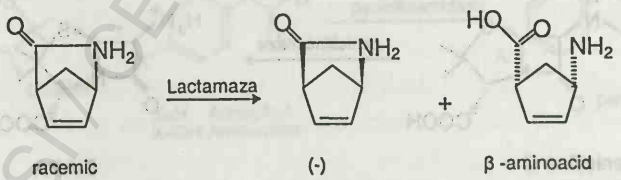


O nouă cale de cercetare în obţinerea de structuri active farmacologic se bazează pe studiul inhibiţiei enzimelor. Între enzimele care prezintă efect farmacologic ca urmare a inhibiţiei lor selective se află şi proteaza HIV. Inhibitorii proteazei HIV se utilizează în terapie în combinaţie cu alte medicamente, cum sunt inhibitorii reverstranscriptazei.

Savinase, preparat enzimatic cu activitate proteolitică, este utilizat în obţinerea unor medicamente anti-SIDA, în mediu de solvent organic. Abacavir este denumirea comercială a unui intermediar în sinteza inhibitorului reverstranscriptazei şi cu rol de agent anti-HIV. În procesele de primă generaţie, substratul – amestecul racemic de γ-lactamă [(±)-2-azabiciclo[2,2,1]-hept-5-en-3-onă] a fost hidrolizat enantioselectiv cu proteaza alcalină Savinase, în mediu de apă-THF. Deoarece concentraţiile mari de substrat duc la procese foarte eficiente, în hidroliză s-a folosit o concentraţie de substrat de 100 g/L.



Firma Chirotech (Exeter, UK) utilizează o γ-lactamază specifică (produsă de *Pseudomonas solonacearum* NCIMB 40249 şi *Rhodococcus* NCIMB 40213) ce catalizează transformarea substratului lactamic neprotejat în lactama chirală (ee>98%) şi β-aminoacidul corespunzător [Bommarius, 2004, Rasor, 2001, Wong, 1995].



Antibioticele sunt medicamente antibacteriene tipice ce interacţionează cu diverse structuri esenţiale în procesul de creştere al acestora. De la descoperirea penicilinei G de către Fleming în 1926, utilizarea antibioticelor a cunoscut o creştere marcantă. În ultima perioadă s-a observat o creştere a rezistenţei bacteriilor la antibiotice şi necesitate obţinerii de structuri noi. Realizarea unui progres în acest domeniu al antibioticelor presupune înţelegerea corespunzătoare a naturii, originii şi modului de acţiune al acestora, şi a cauzelor care duc la creşterea rezistenţei organismelor faţă de antibiotice. Antibioticele ideale trebuie să prezinte stabilitate în mediu acid şi împotriva β-lactamazelor, să prezinte spectru larg de acţiune.

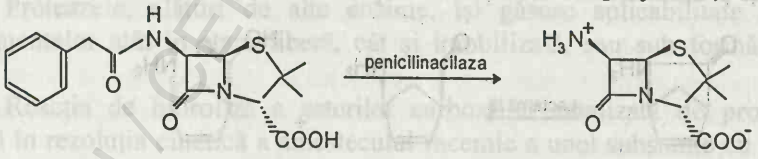
Penicilina G nu poate fi utilizată decât pe cale injectabilă datorită stabilității sale reduse la pH-ul acid din stomac. Penicilina V, ce conține în structura sa o grupare fenoxi, s-a dovedit a fi mult mai stabilă și poate fi administrată oral, drept urmare utilizarea penicilinei G a scăzut drastic. Pe lângă aceste două peniciline numeroase antibiotice semisintetice au fost obținute prin modificarea catenei laterale din penicilina G, enzima implicată fiind penicilinacilaza (tabelul 11.23). Rezistența bacteriilor la antibiotice se bazează de cele mai multe ori pe capacitatea β-lactamazelor specifice de a hidroliza legătura amidică din nucleul β-lactamic al penicilinelor (sau cefalosporinelor), ceea ce determină inactivarea acestora. Inhibitorii β-lactamazelor reduc aceste riscuri [Bommarius, 2004].

Tabelul 11.23.

Proprietățile unor peniciline naturale și semisintetice [Bommarius, 2004]

Antibiotice		Catena laterală	Stabilitate în mediu acid	Rezistența la β-lactamază	Spectru larg de acțiune
Naturale	Penicilina G	$C_6H_5CH_2CO$-	-	-	-
	Penicilina V	$C_6H_5OCH_2CO$-	+	-	-
Semisintetice	Ampicilina	$C_6H_5CH(NH_2)CO$-	+	-	+
	Carbenicilina	$C_6H_5CH(COOH)CO$-	-	-	+

Penicilinacilaza este o serin-esterază ce prezintă atât activitate esterazică cât și activitate amidazică, hidrolizând selectiv resturile fenilacetil din esteri și din amide. Ea prezintă importanță comercială catalizând reacția de hidroliză a benzilpenicilinei cu obținere de acid 6-aminoapenicilanic (6-APA). Acidul 6-aminoapenicilanic constituie partea centrală a penicilinelor și intermediar în obținerea acidului 7-aminodezacetoxicefalosporanic (7-ADCA), nucleul cefalosporinelor. Penicilinele și cefalosporinele fac parte din clasa antibioticelor β-lactamice, cele mai importante și comercializate antibiotice [Phythian, 1998].



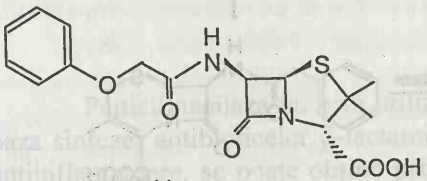
Penicilina G 6-APA

Obținerea acidului 6-aminoapenicilanic din penicilina G se poate face pe cale chimică sau enzimatică. Procedeul enzimatic utilizează o amidază – penicilinacilaza. Penicilinacilaza catalizează dezacetilarea benzilpenicilinei (penicilina G) la pH 7,5 și reacția inversă la pH 6,0. Prin inginerie genetică s-a reușit o îmbunătățire a randamentului de obținere a enzimei, iar utilizarea mai eficientă a enzimei imobilizate a dus la scăderea costurilor de producție. Aceste considerente, la care se adaugă problemele legate de protecția mediului (de

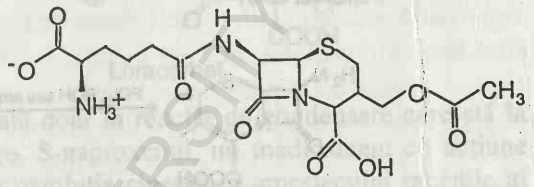
exemplu utilizarea de derivați clorurați în calea chimică) au înclinat balanța în sensul procesului enzimatic, mai ecologic.

Penicilina G, care conține un rest fenilacetat legat de 6-APA și penicilina V, ce conține un rest fenoxiacetat, sunt obținute prin fermentația fungilor *Penicillium chrysogenum*. Toate celelalte peniciline sunt obținute din 6-APA în reacții catalizate de penicilinacilază [Soda, 1987].

Dintre cefalosporine doar cefalosporina C este obținută prin fermentație, celelalte sunt derivați ai 7-ADCA. Nucleul este atașat prin gruparea NH_2 de o catenă laterală care de obicei este chirală, și de multe ori un aminoacid nenatural.



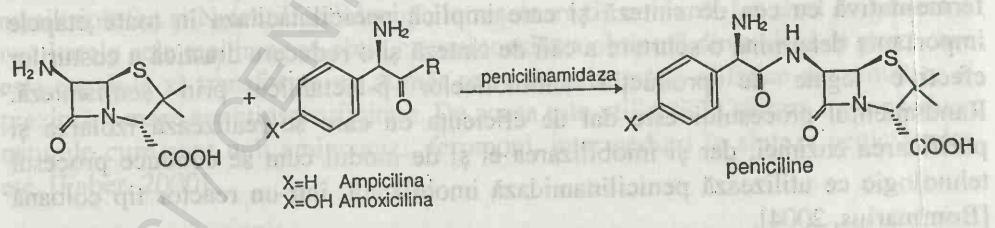
Penicilina V



Cefalosporina C

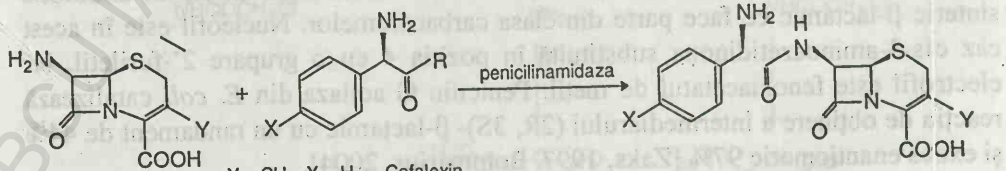
În vederea obținerii unor antibiotice cu calități superioare penicilinelor naturale s-au căutat variante mai active, cu spectru mai larg de acțiune și cu toxicitate redusă. S-au căutat de asemenea structuri acido-rezistente pentru administrare orală și nu intravenos sau intramuscular.

Penicilina G este transformată prin intermediul acidului 6-aminopenicilanic (6-APA) și 7-aminodezacetoxicefalosporanic (7-ADCA) într-o gamă largă de peniciline și cefalosporine de semisinteză: amoxicilină, ampicilină, cefadroxil, cefalexin, cefaclor, ceftriaxone etc.



X=H Ampicilina
X=OH Amoxicilina

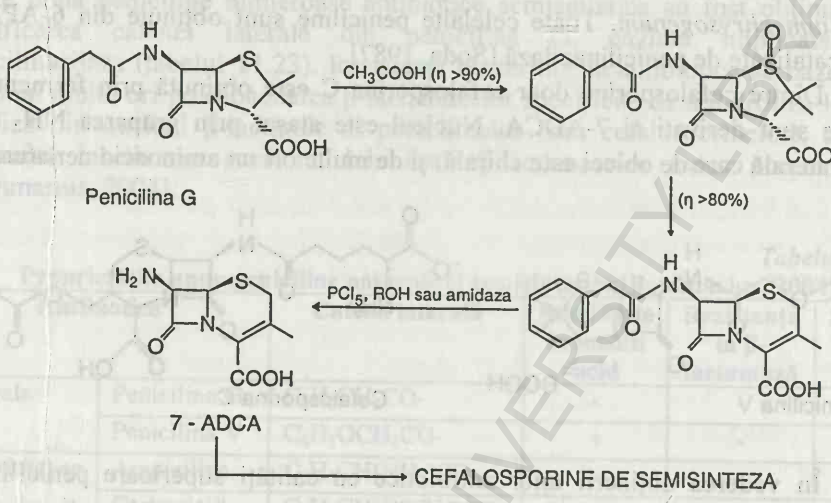
peniciline



Y = CH_3, X = H Cefalexin
Y = CH_3, X = OH Cefadroxil
Y = Cl, X = H Cefaclor

cefalosporine

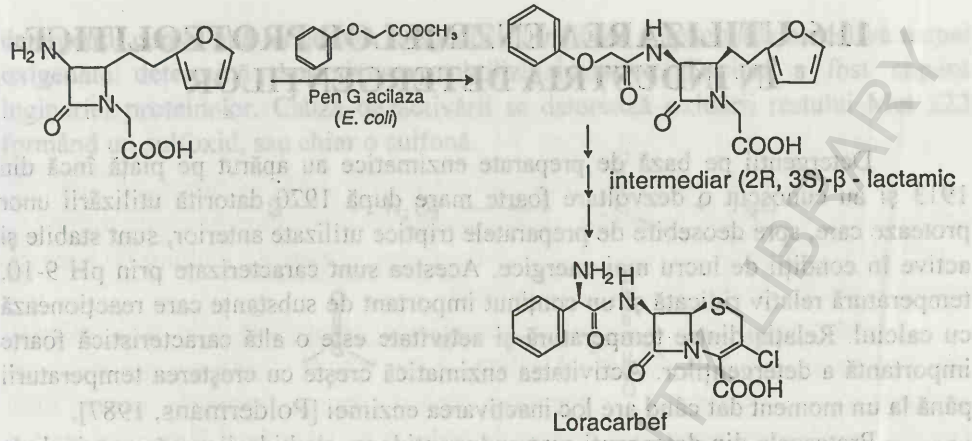
Inițial, 7-ADCA s-a obținut din cefalosporina C, obținută la rândul ei prin fermentația celulelor de *Cephalosporium acremonium*. Totuși, datorită productivității scăzute, producerea de 7-ADCA prin conversia chimică a 6-APA s-a dovedit a fi mai economică [Sheldon, 1993].



Procesul de sinteză al ampicilinei, proces controlat cinetic, prin acilarea acidului 6-aminopenicilanic cu D-fenilglicinamidă decurge în paralel cu reacția de hidroliză a amidei, formându-se D-fenilglicină. Reutilizarea D-fenilglicinei se face prin transformarea acesteia cu HCl în sarea esterului metilic al D-fenilglicinei. Astfel, în proces se utilizează ca donor atât amida cât și esterul și economicitatea procesului crește.

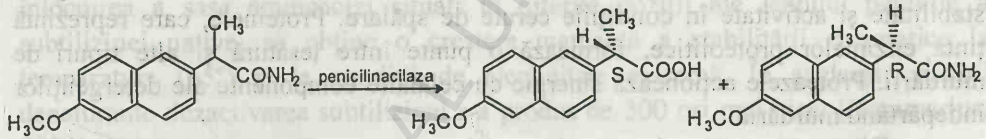
Procesul nou industrial de obținere a antibioticelor, care combină calea fermentativă cu cea de sinteză și care implică penicilinacilaza în toate etapele importante determină o scurtare a căii de sinteză și o reducere drastică a costurilor efective legate de producția antibioticelor β-lactamice prin semisinteză. Randamentul procesului este dat de eficiența cu care se realizează izolarea și purificarea enzimei, dar și imobilizarea ei și de modul cum se conduce procesul tehnologic ce utilizează penicilinamidază imobilizată, într-un reactor tip coloană [Bommarius, 2004].

Principiul utilizat în sinteza antibioticelor cu penicilinacilază pornind de la 6-APA este aplicat și pentru obținerea medicamentului Loracarbef, un antibiotic sintetic β-lactamic ce face parte din clasa carbacefemelor. Nucleofil este în acest caz cis-3-aminoazetidinona substituită în poziția 4 cu o grupare 2'-furiletil, iar electrofil este fenoxiacetatul de metil. Penicilin G acilaza din *E. coli* catalizează reacția de obținere a intermediarului (2R, 3S)- β-lactamic cu un randament de 44% și exces enantiomeric 97% [Zaks, 1997, Bommarius, 2004].



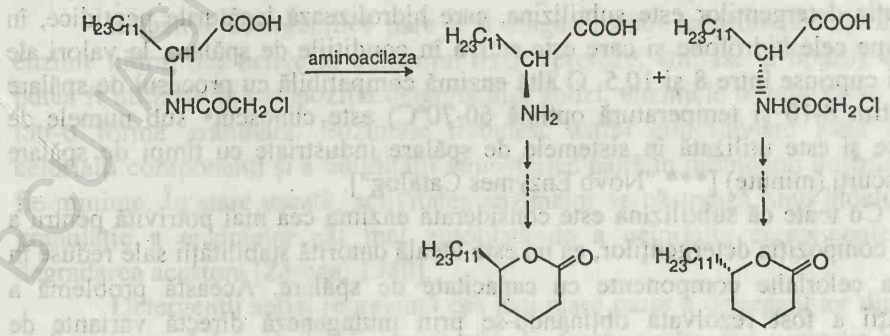
Loracarbef

Penicilinacilaza nu este utilizată doar în reacția de condensare care stă la baza sintezei antibioticelor β-lactamice. S-naproxenul, un medicament cu acțiune antiinflamatoare, se poate obține prin rezoluția cinetică a amestecului racemic al amidei corespunzătoare, reacție catalizată de penicilinacilază produsă de *Rhodococus erythropolis* MP50. Hidroliza enzimatică este condusă în mediu organic cu conținut redus de apă, obținându-se o conversie de 42% și un exces enantiomeric de peste 99%.



S-naproxen

La scară industrială aminoacilaza se utilizează în rezoluția racemicilor N-acetiltriptofan și N-acetilfenilalanină, în reactoare tip coloană. La nivel de laborator rezultatele cele mai bune se obțin cu aminoacilaza obținută din rinichi de porc, care este capabilă să transforme un număr mare de substraturi alifatice și aromatice și prezintă o mare enantiospecificitate. De aceea este utilizată în sinteza unor produse naturale cum sunt unii aminoacizi, feromoni, intermediari în sinteza penicilinelor etc. [Faber, 2000].



feromoni

11.6. UTILIZAREA ENZIMELOR PROTEOLITICE ÎN INDUSTRIA DETERGENȚILOR

Detergenții pe bază de preparate enzimatice au apărut pe piață încă din 1913 și au cunoscut o dezvoltare foarte mare după 1970 datorită utilizării unor proteaze care, spre deosebire de preparatele triptice utilizate anterior, sunt stabile și active în condiții de lucru mai energice. Acestea sunt caracterizate prin pH 9-10, temperatură relativ ridicată și un conținut important de substanțe care reacționează cu calciul. Relația dintre temperatură și activitate este o altă caracteristică foarte importantă a detergenților. Activitatea enzimatică crește cu creșterea temperaturii până la un moment dat când are loc inactivarea enzimei [Poldermans, 1987].

Proteazele din detergenți sunt endopeptidaze, ele hidrolizează proteinele la oligopeptide. Enzimele de acest tip hidrolizează majoritatea proteinelor comune, cum ar fi cazeina, hemoglobina, gelatina, albumina din ou, glutenul, proteina din soia și alte proteine vegetale și animale.

Utilizând detergenții cu enzime se obține o economie de material de spălare, o eficacitate sporită de îndepărtare a murdăriei și o mărire a durabilității articolelor supuse curățirii.

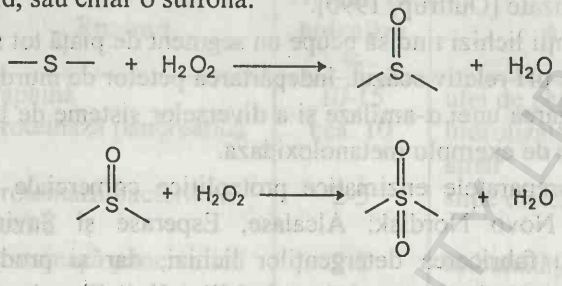
Suplimentarea cu enzime îndeplinește toate cerințele unui detergent, stabilitate și activitate în condițiile cerute de spălare. Proteinele, care reprezintă ținta enzimelor proteolitice, formează o punte între țesătură și alte tipuri de murdării. Proteazele acționează sinergic cu celălalte componente ale detergenților îndepărtând murdăria.

Dintre proteaze, doar serin-proteinazele pot fi utilizate în obținerea detergenților, tiol-proteinazele, cum este papaina pot fi oxidate de agenții de înălbire, proteazele acide nu sunt active în condițiile de spălare, iar metalo–proteinazele (termolizina) își pot pierde cofactorul metalic prin complexare cu agenții de dedurizare ai apei sau agenții care asigură îndepărtarea murdăriei cum sunt polifosfații, acidul nitrilotriacetic sau zeoliții [Bommarius, 2004, Poldermans, 1987].

Detergenții disponibili comercial conțin enzime proteolitice produse în special de tulpini de tipul *Bacillus*. Cea mai importantă enzimă proteolitică din constituția detergenților este subtilizina, care hidrolizează legăturile peptidice, în special pe cele hidrofobe și care este activă în condițiile de spălare, la valori ale pH-ului cuprinse între 8 și 10,5. O altă enzimă compatibilă cu procesul de spălare (pH optim 8-10 și temperatură optimă 60-70°C) este cunoscută sub numele de Esperase și este utilizată în sistemele de spălare industriale cu timpi de spălare relativ scurți (minute) [*** "Novo Enzymes Catalog"].

Cu toate că subtilizina este considerată enzima cea mai potrivită pentru a intra în compoziția detergenților, ea nu este ideală datorită stabilității sale reduse în prezența celorlalte componente cu capacitate de spălare. Această problemă a stabilității a fost rezolvată obținându-se prin mutageneză directă variante de subtilizină mai stabile în timp și la oxidare [Anwar, 1998]. Pe lângă proteaze,

detergenţii conţin apă oxigenată în agenţii de înălbire. Capacitatea oxidativă a apei oxigenate determină dezactivarea subtilizinei native. Enzima a fost supusă ingineriei proteinelor. Cauza dezactivării se datorează oxidării restului Met 222 formând un sulfoxid, sau chiar o sulfonă.



Restul Met 222 este situat în imediata vecinătate a situsului activ, a Ser 221 implicată în triada catalitică, şi influenţează astfel activitatea catalitică a subtilizinei. Prin mutageneză specifică restul Met 222 a fost înlocuit cu alanină sau serină. Stabilitatea la oxidare, exprimată prin activitatea remanentă în soluţie de apă oxigenată 2 M după o oră, este semnificativ crescută.

Pe lângă stabilitatea crescută la oxidare, o subtilizină cu termostabilitate mai bună este o altă cerinţă a industriei de detregenţi. S-a observat că, prin înlocuirea a şase aminoacizi situaţi în diferite poziţii ale lanţului peptidic a subtilizinei native, se obţine o creştere marcantă a stabilităţii enzimatice la temparatur• (65°) şi la condiţii de alcalinitate extremă. În aceleaşi condiţii denaturante dezactivarea subtilizinei s-a produs de 300 ori mai încet [Bommarius, 2004].

Datele de literatură menţionează de asemenea, ca fiind potrivite pentru a fi utilizate în componenţa detergenţilor două proteaze secretate de fungul *Tritirachium album*, notate cu „R" (pH optim 7-10) şi „T" (pH optim 9-12). Temperatura optimă a ambelor enzime este cuprinsă între 55 şi 60°C, şi prezintă o bună stabilitate în prezenţa detergenţilor comerciali. Proteaza alcalină produsă de *Conidiobolus coronatus* prezintă o stabilitate ridicată la valori ale pH-ului mai mari de 8,5, până la temperatura de 40°C pierderile de activitate sunt nesemnificative şi este compatibilă cu cei mai mulţi dintre detergenţii testaţi [Anwar, 1998].

Industria detergenţilor pare a fi singurul mare consumator al diverselor enzime hidrolitice active în domeniul bazic (proteze, amilaze şi lipaze). Pentru a putea fi utilizate în compoziţia detergenţilor solizi, enzimele trebuie să se prezinte într-o formă granulară. Enzimele trebuiesc astfel condiţionate încât acţiunea celorlalţi componenţi şi a umidităţii atmosferice până în momentul utilizării lor să fie minime. În stare uscată, activitatea enzimelor se păstrează timp îndelungat. O granulaţie a enzimelor cât mai apropiată de a celorlalte componente reduce degradarea acestora [Zărnea, 1980].

Detergenţii solizi reprezintă cea mai mare parte a detergenţilor din comerţ şi funcţionează la valori ridicate de pH. În foarte multe ţări protecţia mediului

impune înlocuirea parțială sau completă a fosfaților cu alți agenți de îndepărtare a murdăriei, astfel compoziția deteregenților se modifică, valorile de pH la care se face spălarea cresc până peste 10, iar enzimele care prezintă profil de pH-activitate nu mai pot fi utilizate [Outtrup, 1990].

Detergenții lichizi tind să ocupe un segment de piață tot mai mare. Datorită faptului că au un pH relativ scăzut, îndepărtarea petelor de murdărie este dificilă și se impune adăugarea unei α-amilaze și a diverselor sisteme de înălbire pe bază de enzime, cum este de exemplu metanoloxidaza.

Dintre preparatele enzimatice proteolitice comerciale cele mai utilizate sunt produsele Novo Nordisk: Alcalase, Esperase și Savinase, utilizate cu precădere pentru fabricarea detergenților lichizi, dar și produsele firmei Ibis: Maxatase și Maxacal, Optimase obținut de Miles-Kali Chemie și Kazusase produs de Showa Denko [Zărnea, 1980, Outtrup, 1990, Soda, 1997].

11.7. UTILIZAREA PROTEAZELOR ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ

Hidroliza proteinelor este o reacție des întâlnită în multe domenii ale activității umane și poate fi efectuată pe cale chimică sau pe cale enzimatică.

Hidroliza proteinelor este utilizată pentru a îmbunătăți calitatea peptidelor solubile și a amestecurilor de aminoacizi din alimente și nutrețurile pentru animale (tabelul 11.24). Industria alimentară utilizează hidrolizatele diverselor substanțe proteice pentru fabricarea prafului de supe, a unor produse de carne, dresingurilor, băuturilor proteinizate etc [Peppler, 1987].

În plus se mai cunosc o serie de metode de îmbunătățire a proprietăților funcționale ale proteinelor din soia. Atât puterea de spumare cât și puterea de emulsionare pot fi sporite prin tratarea cu proteinaze bacteriene alcaline. Proteinaze pancreatice speciale pot fi utilizate de asemenea pentru digestia proteinelor din soia. Gradul de hidroliză poate ajunge până la 15% și solubilitatea la pH 5 de cca. 75%, fără să apară gustul amar [Uhlig, 1987].

În procesul de obținere al berii, pentru a preveni tulburarea determinată de reacția dintre polifenolii și polipeptidele din bere, se folosește papaină. Atunci când această enzimă proteolitică rămâne pentru mai mult timp în bere se produce un exces de proteoliză, ceea ce nu este de dorit. Pentru a putea fi îndepărtată ușor, papaina se folosește sub formă imobilizată prin înrețelare cu glutaraldehidă [Peppler, 1987, Outtrup, 1990].

Tabelul 11.24.

Enzimele industriale utilizate în hidroliza proteinelor [Peppler, 1987]

Substrat	Enzimă	Gradul de hidroliză %	Aplicaţii
Resturi de peşte	Papaină	10-15	ulei de peşte, nutreţuri
Peşte	Proteinază pancreatică	cca. 10	hidrolizate fără gust amar
Carne cu oase	Proteinază bacteriană neutră	2-5	supe dietetice
	Proteinază pancreatică	2-8	îmbunătăţeşte stabilitatea spumelor
Proteină din zer	Proteinază pancreatică		peptide solubile, neamare
Cazeină	Proteinază pancreatică	2-2,5	îmbunătăţeşte stabilitatea spumelor
Cazeină	Proteinază pancreatică	37	soluţii medicale medii nutritive (microbiologice)
Cazeină	Proteinază bacteriană neutră	peste 25	cosmetică

Procesarea cărnii

Încă din 1940 se folosesc preparate enzimatice exogene pentru frăgezirea cărnii. Proteinazele realizează digestia ţesuturilor de legătură şi a proteinelor musculare. Enzimele utilizate pe scară comercială sunt papaina, bromelaina şi ficina.

Aceste preparate enzimatice pot fi utilizate doar la suprafaţa cărnii (cum se recomandă în cazul cărnii de pui), sau pot fi injectate sub formă de soluţii în interiorul bucăţilor de carne [Uhlig, 1987].

În literatură sunt descrise diferite procedee de îmbunătăţire a frăgezimii cărnii de vită prin injectarea intraarterială a unei soluţii conţinând enzime proteolitice microbiene. Carnea astfel tratată poate fi utilizată pentru consumul imediat sau se poate păstra sub formă congelată [Zărnea, 1980].

Proteinazele pancreatice sunt utilizate în maturarea cărnii de peşte. Proteinazele bacteriene sunt utilizate pentru descompunerea cărnii cu os [Uhlig, 1987].

Pentru fabricarea membranelor comestibile, pieile sunt tratate cu preparate proteolitice. Se obţin membrane foarte fine pentru salamuri, rezistente la presiune şi temperatură în timpul fierberii şi prăjirii fără a se încreţi, rupe sau a se topi [Zărnea, 1980].

Industria laptelui şi a produselor lactate

Utilizarea biocatalizatorilor în industria laptelui se cunoaşte de sute de ani. Cea mai cunoscută aplicaţie este în industria brânzeturilor unde se folosesc atât biocatalizatori izolaţi, cât şi culturi celulare (lactobacili, streptococi, micrococi) [Peppler, 1987].

Biocatalizatorii sunt responsabili de numeroase reacţii cum ar fi formarea de compuşi aromatici, schimbări în structură şi variaţii ale pH-ului. Aceste procese sunt cunoscute sub numele generic de "fermentaţie".

Un număr de produse fermentate se obţin prin procedee biologice pure, cel mai bun exemplu fiind marea varietate de brânzeturi de pe piaţă.

În tabelul 11.25 sunt prezentate o serie de enzime izolate utilizate în producţia de lactate [Uhlig, 1987].

Tabelul 11.25.

Proteaze utilizate în industria laptelui şi produselor lactate

Tipul enzimei	Sursa enzimatică
Chimozina*(EC 3.4.4.3)	Viţel, miel, ied
Pepsina*(EC 3.4.4.1)	Viţel, porc, pui
Renina	*Mucor miehei, Mucor pusillus, Endothia parasitica, Bacillus subtilis, Mucor racemosus, Bacillus cereus, Bacillus mesenterius, Bacillus polymyxa, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Irpex lacteus, Absidia racemosa, Rhizopus* sp, *Aspergillus oryzae, Aspergillus nidulans* şi *Candida* sp.
Alte proteinaze	
Papaina*(EC 3.4.22.2)	Carica papya
Ficina*(EC 3.4.22.3)	Ficus carica
Tripsina*(EC 3.4.4.4)	Bovine, suine
Chimotripsina*(EC 3.4.4.5)	Bovine, suine

*enzimele sunt utilizate şi în forme imobilizate

Chimozina şi pepsina sunt izolate din mucoasa gastrică a animalelor tinere cum sunt viţeii şi mieii. Raportul pepsină - chimozină din preparatele enzimatice poate varia considerabil, chimozina fiind prezentă numai în stomacul animalelor neînţărcate şi este înlocuită mai apoi de pepsină. Conţinutul de chimozină pură depinde de specia şi vârsta animalului. Numai chimozina este capabilă să transforme specific cazeina. Pepsina şi alte enzime proteolitice sunt mult mai puţin specifice şi dau naştere unor produşi de degradare cu gust mai amar. De aceea obţinerea unei chimozine pure este foarte importantă.

Chimozina este o endoproteinază înalt specifică care scindează numai k-cazeina într-o glicomacropeptidă şi para-k-cazeină prin hidroliza selectivă a legăturii 105-106 dintre fenilalanină şi metionină. Activitatea chimozinei este optimă la un pH cuprins între 5 şi 6. Chimozina măreşte caracterul hidrofob al miceliilor de cazeină conducând la formarea gelului. Activitatea şi specificitatea preparatelor enzimatice de origine animală sunt de o mare importanţă, iar nivelele de chimozină şi pepsină trebuie determinate cu mare acurateţe. Activitatea proteolitică se determină analizând produşii de hidroliză ai cazeinei.

Datorită disponibilităţii limitate a chimozinei pure, reninele microbiene sunt astăzi cele mai utilizate în tehnologia obţinerii brânzeturilor. Prin tehnologia ADN recombinant s-au obţinut un număr mare de produşi biologic activi în procesul de coagulare enzimatică a laptelui. Din *E. coli* şi *Lactobacillus lactis* s-au obţinut cantităţi mari de chimozină în formă de zimogen, prochimozină. Specificitatea altor endopeptidaze a fost examinată analizând fragmentele de peptide rezultate în urma hidrolizei cazeinei sau măsurând nivelul de proteine digerate. Un alt parametru este gustul mai mult sau mai puţin amar generat de peptidele din produşii de fermentatie. A fost studiată capacitatea enzimelor de a coagula laptele, precum şi durata şi temperatura de formare a cheagului [Peppler, 1987].

În procesul de obţinere a brânzeturilor se produc modificări substanţiale ale pH-ului, de aceea trebuie testată dependenţa de pH a activităţii endoproteinazelor specifice. Specificitatea proteinazelor are un rol major în obţinerea diverselor arome ale brânzeturilor.

În ciuda eforturilor depuse de a minimiza diferenţele dintre enzima microbiana şi chimozina animală acestea totuşi există (activitate de coagulare a laptelui diferită, stabilitate termică mărită a enzimei microbiene, ceeea ce duce la intensificarea proceselor de proteoliză în timpul pasteurizării). De aceea deseori se folosesc amestecuri de chimozină şi renină microbiană pentru a reduce degradarea proteolitică nespecifică în urma căreia se obţin produşi cu gust amar [Outtrup, 1990].

Este foarte importantă determinarea componentelor enzimatice individuale din preparatele enzimatice utilizate în fermentaţie. Diversele tipuri de enzime pot constitui impurităţi şi pot afecta în mod neplăcut produsul final. O atenţie deosebită trebuie acordată conţinutului de lipaze din preparatele enzimatice, deoarece acizii graşi liberi influenţează negativ aroma brânzei.

Apa oxigenată este utilizată câteodată în procesul de sterilizare a laptelui, iar excesul de peroxid este îndepărtat prin folosirea catalazei imobilizate. Tripsina este folosită pentru prevenirea gustului de "oxidat". Utilizarea acestei enzime este destul de redusă ca urmare a costului ei destul de ridicat şi incapacităţii de inactivare prin pasteurizare. Pentru a rezolva această problemă s-a studiat utilizarea unei tripsine imobilizate prin legare covalentă de sticlă poroasă [Peppler, 1987].

B. C. U. „M. Kogălniceanu" IAŞI CHIMIE

11.8. UTILIZAREA PROTEAZELOR ÎN HRANA ANIMALĂ

Ca urmare a unor studii îndelungate şi costisitoare, enzimele au început să fie utilizate pe scară largă şi în hrana animalelor, pentru creşterea digestibilităţii substanţelor şi valorii energetice a nutreţurilor, îmbunătăţirea performanţelor productive, utilizarea în proporţii mari a materiilor prime cu digestibilitate mai scăzută şi reducerea hranei pe unitatea de produs. Ele intră astfel în categoria aditivilor furajeri.

Primele studii privind utilizarea enzimelor în hrana păsărilor şi porcilor au fost efectuate cu cca 50 de ani în urmă. Primele produse enzimatice care au apărut pe piaţă erau scumpe, iar activitatea catalitică a acestora la nivelul tubului digestiv era nesatisfăcătoare.

De-a lungul ultimului deceniu, enzimele furajere au devenit unul dintre aditivii alimentari foarte bine acceptaţi în hrana animalelor. Utilizarea lor a crescut constant pe plan mondial şi această tendinţă probabil că se va păstra în viitor. Creşterea popularităţii enzimelor furajere este o consecinţă a modificărilor sociale şi a noilor tendinţe economice şi mai ales a eficientizării producţiilor animale cu impact negativ minim asupra mediului înconjurător [Tucker, 2004].

Prezenţa proteazelor în preparatele enzimatice utilizate ca aditivi furajeri este mai mult decât justificată dacă avem în vedere că proteinele constituie pentru hrana animală un interes deosebit, reprezentând o componentă alimentară foarte importantă şi de asemenea foarte costisitoare din dieta animalelor, fiind de multe ori un factor limitativ în calcularea raţiilor. Compoziţia furajelor s-a modificat mult în ultimii ani. Proteinele de origine animală au fost înlocuite cu proteine vegetale (de exemplu soia se utilizează în procente tot mai mari în compoziţia furajelor). Unele proteine vegetale au valoare nutritivă mai redusă (decât proteinele de origine animală) şi conţin factori antinutriţionali. Este demonstrat că preparatele enzimatice cu activitate proteolitică pot fi utilizate cu succes în creşterea utilizării energiei, a digestibilităţii nutrienţilor şi îmbunătăţirea performanţelor de creştere a puilor şi suinelor hrănite cu o mare varietate de proteine vegetale [Schang, 2002].

Deocamdată sunt disponibile preparate enzimatice eficace doar în anumite situaţii specifice, de aceea este foarte importantă obţinerea şi utilizarea în viitor a unor combinaţii enzimatice cu costuri competitive şi o aplicabilitate largă în creşterea animalelor [Pierce, 2002].

Enzimele digestive ale animalelor monogastrice pot digera numai o parte din substanţele nutritive conţinute de materiile prime furajere. Animalele tinere nu au un echipament enzimatic complet dezvoltat, de aceea, utilizarea digestivă a substanţelor din hrană este mai redusă decât cea a animalelor adulte [Pană, 2000]. Proteinele parţial digerate nu determină numai o utilizare prea puţin eficientă a azotului, ci contribuie şi la o poluare masivă a apei şi la apariţia mirosurilor neplăcute, datorită încărcăturii mari în azot a fecalelor. Utilizarea proteazelor poate fi valoroasă în acest context pentru creşterea valorii nutritive a proteinelor din hrană prin hidroliza tuturor tipurilor de proteine, chiar şi a celor care nu pot fi

digerate de enzimele endogene, şi/sau prin completarea sistemului enzimatic digestiv propriu animalului.

Produsele enzimatice furajere trebuie să ţină cont de particularităţile tubului digestiv şi ale digestiei la diferite specii de animale. Ele trebuie să fie active în condiţiile acide din stomac, să fie rezistente la atacul enzimelor digestive endogene din stomac şi intestinul subţire [Kobayashi, 2002]. Enzime care să îndeplinească aceste caracteristici au fost obţinute prin selecţia riguroasă a microorganismelor producătoare şi mărirea stabilităţii enzimelor furajere prin diferite metode fizice şi chimice.

Proteazele utilizate în hrana animală pot fi de natură endogenă sau exogenă, fiind eliberate de plante, bacterii, mucegaiuri sau ciuperci. Cele mai multe enzime proteolitice utilizate sunt produse de microorganisme, în special de către ciuperci şi bacterii [Marinescu, 1980]. Această atractivitate faţă de microorganismele producătoare de enzime proteolitice se datorează unor avantaje cum sunt: diversitate biochimică mare, uşurinţa de manipulare a lor în mediu, timpi scurţi de fermentaţie, medii de cultură ieftine, uşurinţa dezvoltării proceselor simple de cercetare, existenţa unor proteine-enzime distincte în diferite tulpini, enzime care catalizează aceeaşi reacţie, celulele microbiene pot fi uşor manipulate prin inginerie genetică, obţinându-se astfel cantităţi anormal de mari din enzimele proprii acestor organisme, dar pot fi sintetizate şi proteine străine, proprii celulelor animale. Cele mai utilizate microorganisme pentru sinteza proteazelor de uz furajer sunt tulpinile de *Bacillus subtilis, Bacillus thermoproteolyticus, Bacillus licheniformis, Bacillus amilolichefaciens, Aspergillus saitoi, Aspergillus oryzae, Aspergillus niger* etc.

Cele mai utilizate enzime exogene au fost cele asociate cu dieta bazată pe cereale: glucanazele (xilanază şi β-glucanază) care scindează polizaharidele neamidonoase din cereale, şi mai recent fitazele microbiene care au drept ţintă fitaţii din plantele furajere. Utilizarea glucanazelor exogene în dietele bazate pe grâu şi orz este acum larg întâlnită. Sunt de asemenea disponibile comercial o serie de preparate enzimatice create pentru o mai bună utilizare a proteinelor, amidonului sau lipidelor din furaje [Cafe, 2002, Ghazi, 2003].

Produsele enzimatice utilizate în obţinerea nutreţurilor combinate se găsesc în stare lichidă sau solidă. Având în vedere că tehnologia de obţinere a nutreţurilor combinate poate determina inactivarea enzimelor, o problemă foarte importantă o reprezintă menţinerea stabilităţii, respectiv a activităţii catalitice a acestora până ajung să fie ingerate de animale.

Formele precipitate din mediul de cultură şi apoi uscate sunt mult mai rezistente decât cele lichide. Majoritatea nutreţurilor combinate sunt utilizate în formă granulară, care oferă o serie de avantaje cum sunt: o bună omogenitate, digestibilitate îmbunătăţită, contaminare microbiologică redusă. Dar, acest proces prezintă şi o serie de dezavantaje majore: se desfăşoară la temperatură şi umiditate mare, ceea ce poate duce la pierderea activităţii enzimatice [Pană, 2000]. Aceste inconveniente pot fi înlăturate prin obţinerea unor enzime stabilizate, de exemplu prin imobilizare.

În biotehnologiile actuale se folosesc atât enzime libere cât şi enzime sau celule microbiene imobilizate. Imobilizarea enzimelor are ca scop menținerea stabilității acestora o perioadă mai îndelungată de timp şi la variații ale condițiilor de mediu. Metodele tipice de imobilizare a biomoleculelor pe suporturi anorganice şi organice sunt adsorbția fizică, legarea covalentă, entraparea în membrane semipermeabile şi microincapsularea în microsfere cu structură polimerică şi hidrogeluri. Aceste tehnici nu au caracter general şi în multe cazuri pot fi utilizate doar pentru un număr mic de biomolecule sau în anumite aplicații specifice; problemele legate de desprindere/desorbție, precum şi cele legate de denaturarea biomoleculelor necesită optimizarea protocoalelor de imobilizare de fiecare dată când se utilizează o specie biologică nouă.

Producțiile animale vor constitui totdeauna o parte componentă a vieții noastre şi locul ocupat de ele în nutriția umană este foarte important. De aceea hrana animalelor trebuie privită ca fiind o verigă din lanțul lung de producere a alimentelor destinate pentru hrana umană. Drept urmare furajele şi adaosurile furajere trebuie să fie sigure şi nepericuloase pentru sănătatea omului şi să constituie produse nutritive eficiente, cu alte cuvinte să fie compatibile cu animalul, să fie sigure pentru consumator (100% naturale, controlabile) şi nepoluante față de mediul înconjurător [Lyons, 2000].

Industria producătoare de furaje tinde constant să obțină performanțe productive superioare şi să reducă costurile producțiilor animale, reducând totodată impactul negativ asupra mediului. Utilizarea enzimelor exogene ca aditivi furajeri, alături de aminoacizi, peptide bioactive, biomasă proteică (bacterii, mucegaiuri, drojdii, alge), vitamine, antibiotice, probiotice, prebiotice, oligoelemente, reprezintă o cale practică prin care se poate realiza acest scop [Ferket, 2003]. Odată ce s-a testat şi confirmat o creştere a coeficienților de utilizare a nutrienților ca urmare a folosirii enzimelor, este necesară transformarea acestor beneficii biologice în avantaje economice. Prin această metodă este posibilă o menținere a nivelelor actuale de producție, cu obținerea unor reduceri ale costurilor legate de hrana administrată animalelor.

* * *

Enzimele comerciale constituie, indubitabil, soluția multor probleme vitale cu care se confruntă societatea modernă, cum sunt producerea de alimente, lipsa şi conservarea energiei, protecția mediului înconjurător, alături de numeroasele aplicații din domeniul medical. În viitor, tehnologia enzimelor şi ingineria genetică vor constitui două domenii de studiu foarte strânse, care vor încerca să exploateze creativ folosirea genelor şi a produselor lor în beneficiul umanității.

12. CONVERSIA MATERIALELOR LIGNOCELULOZICE PRIN HIDROLIZA ENZIMATICĂ ŞI FERMENTAŢIE

12.1. COMPONENTELE BIOMASEI DE NATURĂ LIGNOCELULOZICĂ ŞI STRUCTURA LOR

Biomasa vegetală este constituită în principal din celuloză, hemiceluloze şi lignină. Pe lângă acestea, mai conţine şi o serie de componente nestructurale (circa 5% raportat la substanţă) ce include amidon, proteine, oligozaharide şi o mare varietate de substanţe extractibile (terpene, fenoli, răşini) sau neextractibile (regăsite în cenuşă, ca: oxalaţi, carbonaţi, cristale de siliciu). Aceşti compuşi contribuie la rezistenţa materialelor lignocelulozice la degradare şi la atacul insectelor [Fan L.T. şi colab., 1987].

Dintre componentele enumerate, majoritară este celuloza (40-60% raportat la substanţa uscată), ea reprezentând constituentul de bază al pereţilor celulari.

12.1.1. Celuloza

12.1.1.1. Structura celulozei

Structura celulozei pare a fi relativ simplă, deoarece ea este compusă dintr-un singur tip de monoglucid, condensat printr-o legătură repetitivă. Totuşi, există o serie de probleme ce vizează biosinteza celulozei, distribuţia masei moleculare, organizarea sa supramoleculară şi amplasarea în peretele celular.

Celuloza este un poliglucid omogen, macromolecular, format din mai multe unităţi β-D-glucopiranozil, unite prin legături 1,4-β-glicozidice, al căror număr variază între limite largi, respectiv de la 300 la 15.000 [Colvin J. Ross, 1980]. Grupările hidroxil –OH, cele hidroximetil $-CH_2-OH$ cât şi grupările glicozidice sunt situate în poziţii ecuatoriale, iar atomii de hidrogen în poziţii axiale, rezultând o conformaţie scaun. Mai puţin de 2% din unităţile de glucoză pot prezenta forma baie [Franz G. şi W. Blaschek, 1993]. După cum se observă în figura 1A, la suprafaţa glucanului există în special atomi de hidrogen care imprimă moleculei proprietăţi hidrofobe.

Legătura 1,4-β-glicozidică determină o rotire alternativă a unităţilor de glucoză ale lanţului poliglucidic cu 180° faţă de axul principal. Analiza spectrală IR şi spectrele de difracţie cu raze X au indicat faptul că unitatea structurală a celulozei este de fapt un dimer, respectiv celobioza [Coughland M.P., 1992]. Datele de hidroliză enzimatică şi neenzimatică au condus şi ele la concluzia că scindarea legăturii 1,4-β-glicozidice se produce mult mai uşor din două în două, conducând mai curând la formarea celobiozei şi mai puţin a glucozei (în orice caz glucoza fiind ultima etapă a procesului).

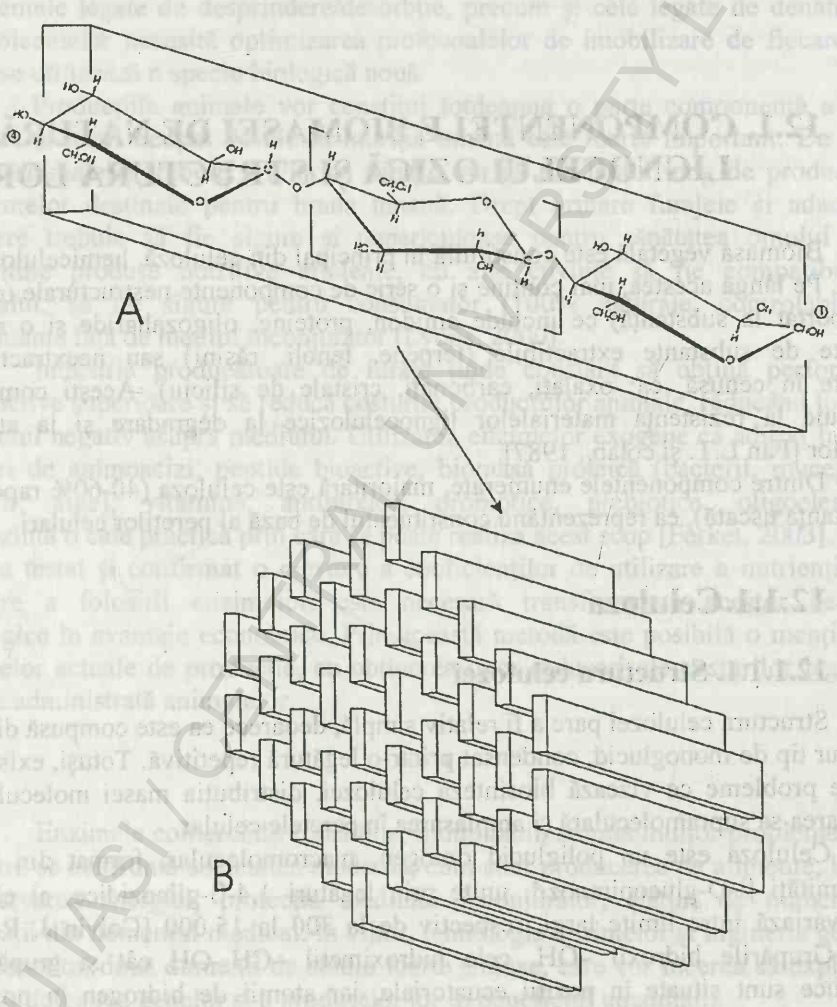


Figura 12.1. Structura unei microfibrile din alcătuirea celulozei A. Lanţ de β-1,4-glucan B. Microfibrilă de celuloză compusă din 36 de lanţuri glucanice[Franz G. şi W. Blaschek, 1993]

Celuloza este un polimer omogen, caracterizat prin legături 1,4-β-glicozidice atât în interiorul dimerului, cât şi între unităţile de celobioză.

Lanţurile poliglugidice obţinute prin condensarea unităţilor de celobioză sunt de forma unor panglici, ce sunt ulterior rigidizate prin punţi de hidrogen intramoleculare. Aceste legături de hidrogen se formează între gruparea hidroxil de la C-3 şi atomul de oxigen al ciclului glucopiranozic aparţinând unei unităţi învecinate. Alte legături de hidrogen, cât şi interacţii electrostatice de tip Van der Waals, se stabilesc şi între grupările hidroxil ale atomilor de carbon C-2 şi C-6 (fig. 12.2). Punţile de hidrogen se realizează atât intramolecular cât şi intermolecular, determinând asocierea lanţurilor poliglucidice în structuri paralele numite microfibrile (fig. 12.3). Acestea sunt alcătuite din şaizeci până la şaptezeci de lanţuri poliglucidice adiacente şi au lăţimi ce variază între 10 nm pentru celuloza din lemn şi cea bacteriană, până la 25-30 nm în cazul celulozei din algele marine [Colvin J. Ross, 1980]. Atât legăturile de hidrogen cât şi forţele de tip Van der Waals nu sunt puternice, dar, luând în considerare numărul lor mare, rezultatul este un veritabil monolit. Aceasta este de fapt explicaţia rezistenţei mecanice pe care o conferă celuloza pereţilor celulari.

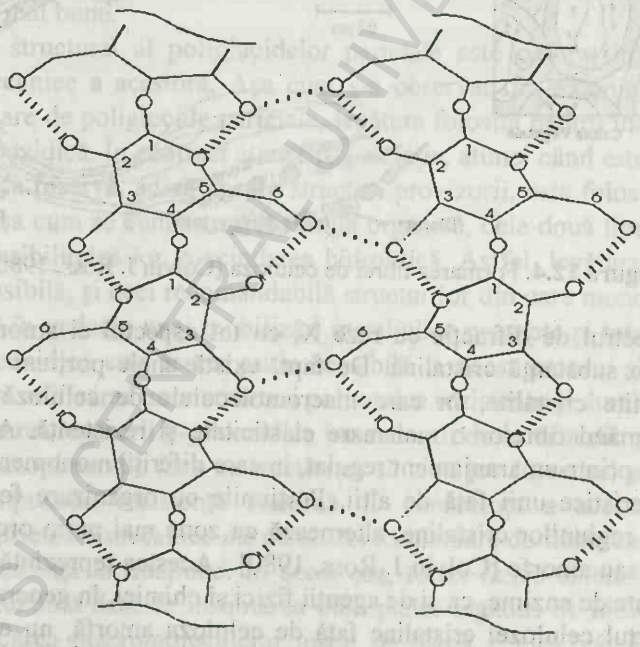


Figura 12.2. Legături de hidrogen intramoleculare (111) şi intermoleculare (•••) formate între două lanţuri poliglucidice învecinate din structura celulozei [Colvin J. Ross, 1980].

În ţesuturile vegetale, mai multe microfibrile se unesc între ele prin legături de hidrogen şi formează fibrele de celuloză (fig. 12.4). Lungimea fibrelor depinde de sursa biologică şi de condiţiile de extragere a celulozei. Moleculele de celuloză care au un aspect filiform, liniar, nu sunt egale ca lungime şi nu se aranjează toate paralel în fibre, fapt ce imprimă celulozei un aspect amorf.

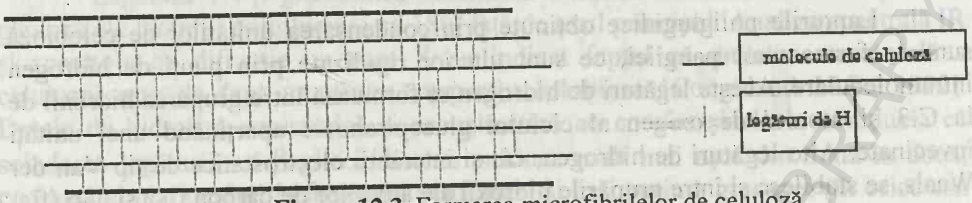


Figura 12.3. Formarea microfibrilelor de celuloză

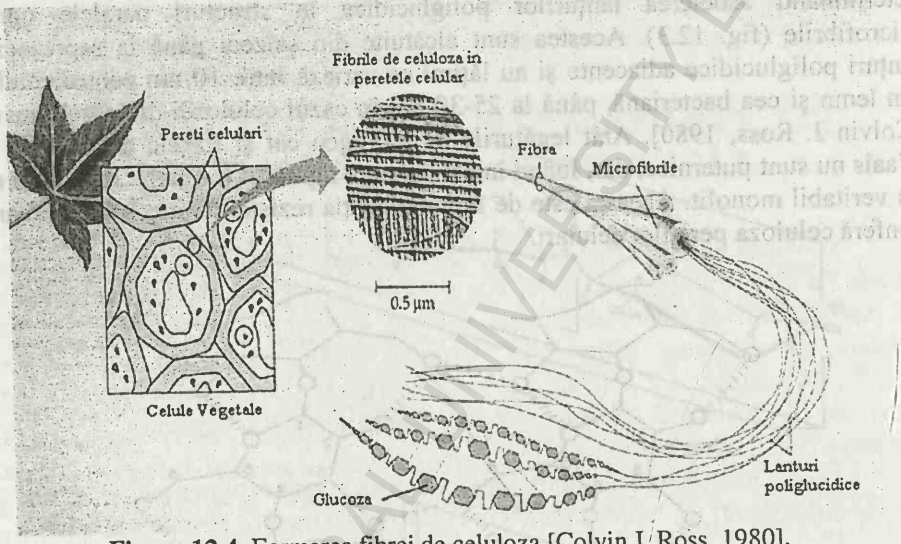


Figura 12.4. Formarea fibrei de celuloza [Colvin J. Ross, 1980].

În spectrul de difracţie cu raze X, cu tot aspectul ei amorf, celuloza se comportă ca o substanţă cristalină. De fapt, există unele porţiuni din fibrele de celuloză, numite cristalite, în care macromoleculele de celuloză se aranjează paralel, imprimând fibrelor o mai mare elasticitate şi rezistenţă. Aceste zone se caracterizează printr-un aranjament regulat, în care diferiţii monomeri ocupă poziţii fixe şi caracteristice unii faţă de alţii. Porţiunile cu organizare foarte ordonată, corespunzând regiunilor cristaline, alternează cu zone mai puţin ordonate, numite paracristaline sau amorfe [Colvin J. Ross, 1980]. Acestea reprezintă regiunile cele mai uşor atacate de enzime, ca şi de agenţii fizici şi chimici, în general.

Raportul celulozei cristaline faţă de celuloza amorfă, nu este întâmplător, fiind specific sursei biologice. Gradul de cristalinitate a celulozei variază de la 70-80% în bumbac, până la 60-70% în lemn şi 40-50% în celuloza regenerată.

Formula moleculară a celulozei este $(C_6H_{10}O_5)_n$. Deoarece în molecula celulozei, resturile de glucoză au trei grupări hidroxil, formula moleculară se poate scrie şi $[C_6H_7O_2(OH)_3]_n$. Gradul de polimerizare a unităţii repetitive (160 Da) variază între 300-15.000, considerând că masa moleculară a celulozei se situează între $5x10^4$ şi $2,5x10^6$. Gradul de polimerizare diferă în funcţie de sursa biologică, fiind de aproximativ 14.000 în celuloza din plante şi aproximativ 3.500 în cea

produsă de bacterii [Coughland M.P., 1992]. Lungimea lanţului glucanic este cuprinsă între 0,15 şi 7,2 μm.

Metoda convenţională pentru controlul conţinutului de celuloză cu grad de polimerizare mare constă în tratarea cu NaOH soluţie 17,5% până la imbibiţie. Partea insolubilă se numeşte *α-celuloză* şi are grade de polimerizare mai mari de 100; din soluţia alcalină, prin precipitare cu acid acetic, rezultă *β-celuloza,* un hemicoloid cu n = 10 ... 100, iar în soluţie rămâne *γ-celuloza,* un amestec de oligozaharide cu n < 10 [Zarnea G. şi colab., 1980].

12.1.1.2. Proprietăţi fizice

Celuloza este o substanţă solidă, microcristalină, cu aspect amorf, de culoare albă, fără gust şi miros, cu un slab caracter reducător.

Macromoleculele de celuloză sunt filiforme, cu structură liniară, prezintă elasticitate şi rezistenţă mecanică, proprietăţi care depind foarte mult de gradul de polimerizare. Cu cât gradul de polimerizare este mai mare, calităţile mecanice ale celulozei sunt mai bune.

Rolul structural al poliglucidelor parietale este datorat în mare măsură rezistenţei mecanice a acestora. Aşa cum s-a observat din examinarea structurii unui număr mare de poliglucide parietale, legătura folosită pentru încatenare a fost legătura β-glicozidică. În contrast cu această situaţie, atunci când este vorba despre poliglucidele de rezervă, adică despre structuri provizorii, este folosită legătura α-glicozidică. Aşa cum se cunoaşte din chimia organică, cele două tipuri de legătură diferă prin sensibilitatea lor la scindarea hidrolitică. Astfel, legătura α-glicozidică este foarte sensibilă, şi deci recomandabilă structurilor din care monomerul trebuie deblocat rapid în vederea unei mobilizări metabolice prompte şi totale, în timp ce legătura β-glicozidică este foarte puţin sensibilă la acest proces, şi prin urmare, potrivită pentru edificarea unor structuri polimerice rezistente şi durabile.

Realizarea legăturii β-glicozidice între atomii de carbon din poziţiile 1 şi 4 ale ciclului glucopiranozic face ca tracţiunea să aibă loc în sensul axului catenar, conferind compusului rezistenţă maximă. O consecinţă a acestei structuri o reprezintă proprietăţile mecanice ale celulozei formatoare de fibre, care manifestă o pronunţată rezistenţă la tracţiune. În acest caz, forţei fizice exterioare aplicate îi este opusă rezultanta dată de însumarea multiplelor legături de hidrogen (care nu permite alunecarea macromoleculelor unele pe lângă altele), cât şi cea dată de legăturile covalente puternice ale încatenării. În acest fel, legătura de hidrogen, deşi este o forţă slabă în raport cu forţa fizică exterioară, prin repetarea sa la intervale scurte în interiorul fibrilelor, ajunge să opună o rezistenţă suficient de mare.

Celuloza nu se dizolvă în apă şi nici în solvenţi organici. În contact cu apa are loc, de fapt, un proces de imbibiţie, care se realizează prin aderarea moleculelor de solvent la suprafaţa fibrilelor, acestea neputând pătrunde la catenele poliglucidice din interior. Acest fapt face dintr-un compus plin de grupări hidrofile –OH unul de o hidrofobie remarcabilă, dovedind că structura unui compus poate

schimba posibilitățile de manifestare ale elementelor sale componente. Absența solubilității în apă are consecințe în planul reactivității pe care o condiționează prin realizarea contactului reactanților.

Celuloza este solubilă numai în reactivul Schweitzer $[Cu(NH_3)_4](OH)_2$, hidroxid tetraaminocupric. Din soluția acestui reactiv, celuloza reprecipită prin adăugare de acizi minerali.

În soluție slab alcalină (NaOH 5%), îmbibarea este foarte puternică, iar celuloza cu un grad mic de polimerizare, sub 300, se dizolvă.

Celuloza se colorează în albastru-violet cu cloroiodura de zinc.

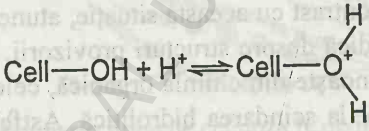
Fibrele de celuloză din bumbac au o lungime de 20-30 mm și pot fi toarse în fire, iar fibrele din lemn sunt foarte scurte, de 3-5 mm, neputând fi toarse în fire.

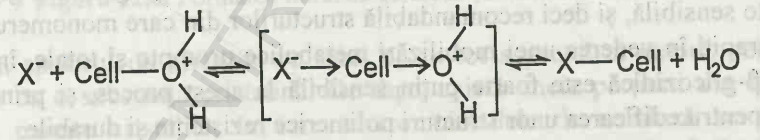
12.1.1.3. Proprietăți chimice

Reacția de esterificare

La nivelul hidroxizilor liberi, celuloza dă reacții de esterificare cu acizi, în prezența agenților de deshidratare.

Mecanismul reacției constă în formarea unui ion oxoniu al celulozei, urmat de substituția nucleofilă.





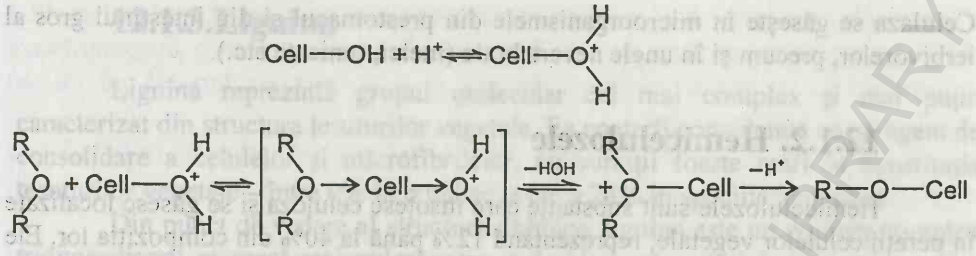
Din celuloză și acid azotic se obțin esteri nitrici numiți impropriu nitroderivați. Se cunosc mono-, di- și trinitroderivați de celuloză:

$[C_6H_9O_2(ONO)_2]$	$[C_6H_8O_3(ONO)_2]$	$[C_6H_7O_2(ONO)_3]$
Mononitroceluloză	Dinitroceluloză	Trinitroceluloză

Dinitroceluloza împreună cu camforul formează celuloidul, care este întrebuințat la fabricarea filmelor fotografice și cinematografice. Celuloidul prezintă dezavantajul că este o substanță inflamabilă.

Reacția de eterificare

Formarea derivaților eterici este comparabilă cu formarea esterilor, de exemplu ionul oxoniu este substituit secvențial, după cum este prezentat mai jos:



Reacţia de hidroliză

Celuloza se degradează hidrolitic, conform reacţiei generale:

$$R_1—O—R_2 + HOH \xrightleftharpoons{Hidroliza} R_1—OH + R_2—OH$$

Hidroliza celulozei se poate realiza fie prin metode chimice, folosind acizi, fie prin procedee enzimatice, utilizând enzime specifice.

Hidroliza acidă

Deşi din punct de vedere chimic celuloza este un polimer omogen, totuşi în ţesuturile vegetale este întotdeauna însoţită de alţii. Este evident că aceşti compuşi necelulozici trebuie să fie eliminaţi prin metode nedestructive.

În scopuri industriale, celuloza este supusă iniţial cracării în abur urmată de o răcire rapidă, procedeu ce duce la eliminarea hemicelulozelor. Mai mult, o mare parte din lignină devine apoi solubilă în soluţii bazice diluate, sau în solvenţi organici. Extracţia ligninei conduce la obţinerea unei celuloze relativ pure, ce urmează să fie supusă hidrolizei.

$$Cell—OH \xrightarrow{NaOH} Cell—ONa$$

Metoda clasică de hidroliză acidă a celulozei este cu H_2SO_4 72 %. În acelaşi mod se poate folosi şi HCl 41 % şi H_3PO_4 85 % (Wayman, 1986). Rolul acestor acizi minerali concentraţi este de a dizolva α-celuloza la temperaturi scăzute (4-20°C). Hidroliza completă până la monomerul corespunzător este realizată cu acizi diluaţi (3-6 %), la temperaturi de 100-120°C, timp de 30-360 minute. Creşterea temperaturii şi a presiunii măreşte viteza de reacţie si conduce la creşterea concentraţiei de glucoză.

Hidroliza celulozei cu HCl concentrat (40 %), în prezenţa unor cationi (Li^+, Ca^{2+} şi Zn^{2+}), are loc în condiţii mai putin severe, iar glucoza eliberată este mai stabilă decât cea rezultată la hidroliza cu H_2SO_4.

Pentru celuloza din lemn s-a pus la punct un procedeu de hidroliză cu HF în instalaţii de distilare în vid, timp de 60 de minute.

Procedeele de hidroliză acidă se desfăşoară în instalaţii speciale, folosindu-se acizi minerali tari cu concentraţii foarte mari, la temperaturi ridicate şi au o durată destul de mare.

Hidroliza enzimatică

Pe cale biologică, celuloza se degradează hidrolitic, sub acţiunea unui complex enzimatic specific numit generic *celulază.* Această enzimă degradează celuloza în celobioză, care sub acţiunea celobiazei va forma β-D-glucopiranoză.

Celulaza se găsește în microorganismele din prestomacul și din intestinul gros al ierbivorelor, precum și în unele nevertebrate (melci, tunicate etc.).

12.1.2. Hemicelulozele

Hemicelulozele sunt substanțe care însoțesc celuloza și se găsesc localizate în pereții celulelor vegetale, reprezentând 12% până la 40% din compoziția lor. Ele sunt poliglucide care au grad de polimerizare relativ redus, cuprins între 150 și 200.

Hemicelulozele există sub formă de homopoliglucide (β-glucani), dar cel mai adesea sub formă de heteropoliglucide, la hidroliza cărora rezultă pentoze (în cantitate mare D-arabinoză și D-xiloxă), hexoze (preponderent D-glucoză, D-galactoză și D-manoză) și acizi uronici formați prin oxidarea glucidelor (în special acid galacturonic). Xiloza este glucidul omiprezent în cantitatea cea mai mare, în mod deosebit la speciile lemnoase. Glucidele din constituția hemicelulozelor pot fi substituite cu acid acetic.

Monoglucidele sunt condensate în poziția β-1,4 dar și β-1,3 și β-1,6, fapt ce le conferă structuri ramificate [Campeanu G. și colab., 1993] și care împiedică formarea de microfibrile. Ele formează o matrice, în care sunt înglobate microfibrilele de celuloză prin intermediul punților de hidrogen.

Spre deosebire de celuloză care este preponderent cristalină, puternică și rezistentă la hidroliză, hemicelulozele adoptă o structură amorfă, cu rezistență mecanică redusă.

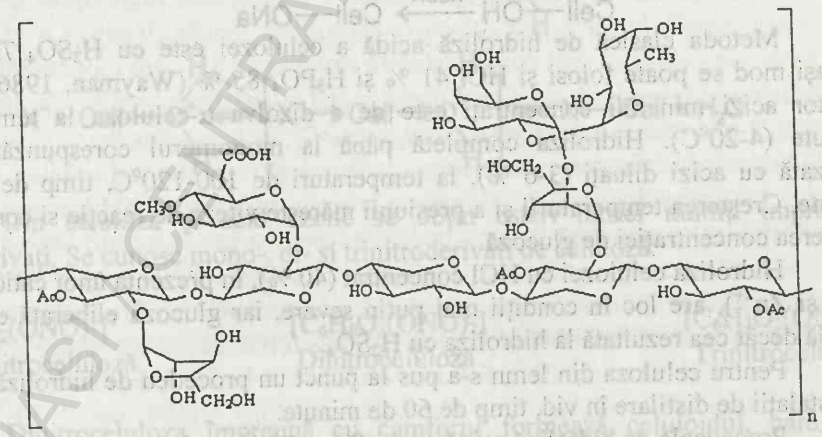


Figura 12.5. Fragment de hemiceluloză.

Hemicelulozele sunt ușor hidrolizate cu acizi sau baze diluate, existând și enzime capabile să le hidrolizeze, denumite hemicelulaze (de tip endo si exo). Degradarea enzimatica a hemicelulozelor este mai rapidă decât cea a celulozei și mai intensă în aerobioză decât în anaerobioză.

12.1.3.Lignina

Lignina reprezintă grupul molecular cel mai complex şi mai puţin caracterizat din structura ţesuturilor vegetale. Ea poate fi considerată ca un agent de consolidare a celulelor şi microfibrilelor, cu variaţii foarte mari în constituţia ţesuturilor vegetale – între 0% în bumbac şi circa 28% în speciile lemnoase.

Din punct de vedere al structurii chimice, lignina este un polimer complex tridimensional, cu masă moleculară mare, având la bază unităţi de fenil propan (fig. 6). Acest compus macromolecular rezulta prin cuplarea aleatorie a trei tipuri de alcooli precursori: alcoolul p-cumarilic (p-hidroxicinamil) care formează în polimer unităţi de p-hidroxifenil, alcoolul coniferilic (4-hidroxi-3-metoxicinamil) care formează unităţi guaiacil şi alcoolul sinapilic (3,5-dimetoxi-4-hidroxicinamil) care formează în polimer unităţi de siringil. Cuplarea acestor structuri se realizează prin legături covalente de tip eteric şi de tip carbon-carbon.

În timpul formării celulelor vegetale, lignina se inserează între microfibrilele de celuloză, conferind astfel rigiditate şi rezistenţă mecanică pereţilor celulari. Studii de structură au arătat că între lignină şi poliglucidele din compoziţia biomasei lignocelulozice există legături puternice, de tip covalent, ceea ce face ca detaşarea ligninei în vederea facilitării hidrolizei celulozei să fie o problemă esenţială.

Figura 12.6. Fragment de lignină

Lignina gimnospermelor conţine predominant structuri de tip coniferil, în timp ce lignina angiospermelor este formată din cantităţi aproximativ egale de unităţi coniferil şi sinapil şi cantităţi mai mici de unităţi de alcool p-cumarilic [Fan L.T. şi colab., 1987].

Corespunzător structurii complexe a ligninelor, procesele de degradare enzimatica sunt foarte complexe şi implică o mare diversitate de reacţii şi de produşi.

Ligninaza (ligninperoxidaza) - enzima cheie a ligninolizei, a fost descoperită, simultan, de Kirk şi Tien (1983) şi de Gould şi colaboratorii săi (1983, 1984) în lichidul culturii de

Phanerochaete chrysosporium. Este o oxidoreductază cu greutate moleculară 42 – 42 KDa, care conține hem. Tien si Kirk (1984) au definit-o ca o oxigenază care necesită peroxid pentru oxidarea ligninei și a compușilor înrudiți cu ea, cu producere de radicali cationici.

Mn peroxidaza este o enzimă diferită de ligninază, prezentă în lichidul de creștere a fungilor de putregai alb. Funcționează ca o enzimă care oxidează fenolii și participă, probabil, la producerea de H_2O_2.

Fenoloxidaxele sunt enzime extracelulare, produse în cantități mari de cei mai mulți fungi de putregai alb. Sunt reprezentate de laccază și peroxidază.

12.1.4. Materiile pectice

Materiile pectice sunt reprezentate în principal de acidul pectic și sărurile sale, pectina, pectați și o serie de poliglucide neutre care pot fi asociate pectinei.

Acidul pectic este un polimer, având în structura sa circa 100 de molecule de acid galacturonic unite prin legături α-1,4 glicozidice (fig.7) și prezintă dispunere spațială de tip helicoidal. Cu ionii de calciu și magneziu formează săruri. Acest poliglucid este foarte hidrofilic și solubil, având capacitatea de a forma geluri. Datorită prezenței grupărilor carboxil în structura lor, moleculele de acid galacturonic pot fi considerate acizi slabi, ce pot exista în stare neutră sau încărcată negativ, în funcție de pH-ul mediului.

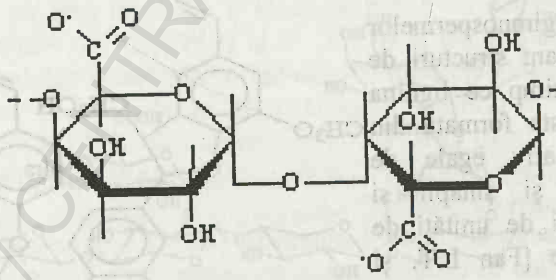


Figura 12.7. Fragment de acid pectic.

Pectina este un poliglucid constituit din circa 200 de molecule de acid galacturonic, în care o mare parte din grupările carboxil sunt metilate (fig. 8). Uneori lanțurile poligalacturonice sunt întrerupte prin inserția de α-L-ramnopiranoză. De asemenea, lanțurile periferice pot avea atașate resturi de D-galactoză, L-arabinoză și D-xiloză.

Pectina este mai puțin hidratată decât acidul pectic, dar este solubilă în apă fierbinte, având proprietatea de a forma geluri transparente.

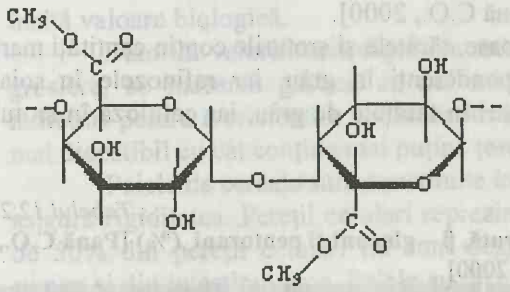


Figura 12.8. Fragment de pectina

Enzimele care catalizează hidroliza substanţelor pectice sunt reprezentate de esteraze (pectinesteraze, pectinmetilesteraze) şi poligalacturonaze.

Materiile pectice au un rol însemnat în consolidarea ţesuturilor celulozice şi în reglarea permeabilităţii celulare, fiind factor esenţial în determinarea porozităţii parietale [Campeanu G. şi colab., 1993].

12.1.5. Subproduse şi deşeuri agroalimentare de natură lignocelulozică

Subprodusele şi deşeurile agroalimentare sunt reprezentate în principal de paiele şi pleava de cereale, cocenii şi ciocălăii de porumb, vreji şi resturi de leguminoase, capitulele şi tulpinile de floarea-soarelui, şroturi de soia şi floarea soarelui, deşeuri rezultate de la industrializarea legumelor şi fructelor.

Raportul în care se găsesc componentele din structura materialelor lignocelulozice variază în funcţie de mai mulţi factori: specia de plante, faza de vegetaţie, condiţiile de climă din perioada de vegetaţie, tipul de sol, tehnologia de cultivare.

Tabelul 12.1.

Variaţia conţinutului de celuloză pură, lignină şi pentozani a ierburilor de graminee în raport cu faza de vegetaţie (%)

Fază de vegetatie a plantei	Celuloză	Lignină	Pentozani
La înfrăţire	12,4	5,6	5,3
La începutul înfloririi	18,0	7,5	8,3
La formarea semințelor	23,4	10,6	13,0

Luând în considerare faza de vegetaţie, conţinutul de celuloză variază de la mai puţin de 20% din substanţa uscată a plantelor în faza tânără de vegetaţie până la 45% la plantele la care semințele au ajuns la stadiul de maturare (tabelul 1).

La porumb conţinutul de lignină variază în limite largi, atât în funcţie de stadiul de vegetaţie şi condiţiile de creştere, cât şi în funcţie de raportul dintre

frunze şi tulpini. Conținutul de lignină creşte foarte mult în faza de coacere, în special în frunze, tulpini şi ciocălăi [Pană C.O., 2000].

Cerealele, boabele de leguminoase, tărâțele şi şroturile conțin cantități mari de celuloză. Arabinoxilanii sunt preponderenți în grâu, iar rafinozele în soia. Pentozani se găsesc în cantități mai mari în tărâțele de grâu, iar celuloza în şrotul de floarea soarelui (tabelul 2).

Tabelul 12.2.

Conținutul unor nutreţuri în celuloză brută, β – glucani şi pentozani (%) [Pană C.O., 2000]

Nutreț	Celuloză totală	β – glucani	Pentozani
Paie orz	37,6	15 - 27	57 - 70
Paie ovăz	38,7	30 – 66	55 – 69
Paie secară	38,34	5 – 30	75 – 91
Paie grâu	37,4	2 – 15	55 – 95
Triticale	30	2 – 20	54 – 69
Porumb coceni + ciocălăi	32,9 30,1	1 – 2	40 – 43
Tărâțe grâu	27,7	*	75 – 95
Mazăre	6,1	*	50 – 60
Şrot soia	34 -59	*	30 – 45

Se poate aprecia că deşeuri agricole sunt produse în cantități impresionante. Astfel, în țara noastră, producția agricolă se completează anual şi cu 5-7 milioane tone paie şi pleavă, 11-13 milioane tone coceni de porumb, 2 milioane tone ciocălăi, 1 milion tone vreji şi capitule etc.

În viitorul imediat, utilizarea acestor produse va constitui o sfidare biotehnologică deoarece în prezent, ca atare sau prin metodele actuale de preparare, produsele sunt valorificate aproape exclusiv pentru hrana animalelor cu un coeficient de digestibilitate destul de redus.

Şi pentru alte domenii tehnicile biotehnologice constituie o provocare, prin ele deşeurile şi subprodusele de natură lignocelulozică devenind o resursă importantă pentru obținerea unor produse. Degradarea şi transformarea de către microorganisme a substanțelor celulozice şi hemicelulozice permit obținerea etanolului şi a materiilor prime pentru industria chimică (furfuroli, fenoli, crezoli). Din 200.000 tone de paie transformate în mod eficient ar putea fi produse 50.000 tone de etanol şi 20.000 tone de furfurol. După unii specialişti, 30% din compuşii de origine petrochimică ar putea fi obținuți pornind de la transformările microbiene ale celulozei.

În ultimul timp se face resimțită o tot mai acută lipsă de proteine echilibrate de tip animal, ceea ce a dus la intensificarea cercetărilor asupra obținerii de biomase furajere sau alimentare. Se caută obținerea de microorganisme polifage, susceptibile de a metaboliza produse agricole şi deşeuri din industria agro-

alimentară, în vederea producerii de aminoacizi şi de biomase bogate în proteine cu înaltă valoare biologică.

Datorită valorificării digestive reduse a substanţelor nutritive din furajele grosiere, se încearcă găsirea de noi metode şi tehnici de preparare a acestor nutreţuri pentru a eficientiza folosirea lor în nutriţia animală, un furaj fiind cu atât mai digestibil cu cât conţine mai puţine ţesuturi lignificate.

Paiele de cereale sunt constituite în principal, din ţesuturi lignificate care le asigură rigiditatea. Pereţii celulari reprezintă peste 3/4 din substanţa uscată: în jur de 50% din pereţii celulari nu sunt degradabili de către microorganismele din rumen şi din intestinul gros. Paiele au, în consecinţă, o digestibilitate foarte scăzută (circa 45%), sunt prea sărace în totalitatea constituenţilor intracelulari (minerale, proteine etc.) necesari, mai întâi pentru microorganisme, apoi pentru animalul gazdă. Ele sunt foarte rezistente la masticaţie, sunt ingerate lent şi necesită o durată mare pentru rumegare.

12.2. SISTEMUL POLIENZIMATIC CELULAZIC

12.2.1. Componentele sistemului celulazic

Sistemul celulazic este alcătuit din enzime hidrolitice capabile să hidrolizeze celuloza până la glucoză. Aceste enzime sunt produse de microorganisme şi plante. În regnul animal, ele sunt prezente prin intermediul microorganismelor simbiotice.

Componentele sistemului celulazic au fost iniţial clasificate doar pe baza acţiunii lor catalitice, însă studiile recente iau în considerare şi proprietăţile lor structurale. De importanţă majoră în procesul de degradare a celulozei sunt trei tipuri de hidrolaze, ce au rolul de scindare a legăturilor β-glicozidice [Duff S. J. B. şi Murray W.D., 1996; Persson I. şi colab., 1991; Lynd L.R. şi colab., 2002]:

- ***Exo-1,4-β-glucanaze*** ce includ ***glucanohidrolaze*** sau ***celodextrinaze*** (1,4-β-D-glucan:glucanohidrolaze, EC 3.2.1.74) şi ***celobiohidrolaze*** (1,4-β-D-glucan: celobiohidrolaze, EC 3.2.1.91), CBH, care atacă sistematic molecula de celuloză la capătul nereducător al lanţului poliglucidic, eliberând preponderent molecule de glucoză (glucanohidrolaze) sau de celobioză (celobiohidrolaze);
- ***Endoglucanaze*** sau ***endo-1,4-β-glucanaze*** (1,4-β-D-glucan:4-glucanohidrolaze, EC 3.2.1.4), EG, care operează aleatoriu în interiorul lanţului de celuloză, generând oligoglucide cu grad de polimerizare diferit;
- ***Celobiaze*** sau ***β-glucozidaze*** sau (β-D-glucozid:glucohidrolaze, EC 3.2.1.21), BG, care hidrolizează celobioza, dar în acelaşi timp şi celotrioza şi celotetroza, cu formare de glucoză.

Aceste enzime acționează sinergic pentru a decristaliza și a hidroliza celuloza nativă.

Enzimele celulozolitice, izolate din diverse surse, diferă în ceea ce privește caracteristicile moleculare (masă moleculară, compoziție și secvență de aminoacizi, punct izoelectric, conținut de glucide), capacitate de adsorbție la suprafața fibrelor de celuloză, activitate catalitică și specificitate de substrat. Aceasta conduce la o mare varietate a sistemelor celulazice în funcție de sursa de obținere, care diferă din punct de vedere al compoziției și al proprietăților catalitice. Astfel, există sisteme celulazice ce au doar două sau trei componente individuale (incluzând cel puțin o endoglucanază), dar și sisteme ce conțin 15-20 sau chiar mai multe componente [Esterbauer H. și colab., 1991; Hayn M. și colab., 1993].

Cercetări recente au demonstrat că sistemul celulazic sintetizat de fungi conține, pe lângă enzimele mai sus menționate ca fiind esențiale în procesul de hidroliză, și alte enzime care au rol în etapa premergătoare hidrolizei, respectiv etapa de hidratare a fibrelor de celuloză [Coughland M.P., 1992].

- Celobiochinondehidrogenaza (celobioză:chinon-1-oxidoreductaza; EC 1.1.5.1);
- Celobiozoxidaza (celobioză:acceptor-1-oxidoreductaza; EC 1.1.99.18);
- Lactonaza (D-glucono-1,5-lactonohidrolaza; EC 3.1.1.17).

Studiile de purificare și fracționare ale enzimelor din complexul celulazic au relevat faptul că toate aceste enzime, în special cele trei tipuri majore de enzime celulozolitice, sunt biosintetizate de microorganisme în forme multiple, numite izoenzime, dintre care se pot izola un număr variabil de fracțiuni, atât în funcție de natura mediului de cultură folosit cât și de tehnicile utilizate. Eveleigh (1987) a arătat că pot exista mai multe cauze care să conducă la această multiplicitate [Coughland M.P., 1992]:

a. microeterogenitatea datorată complexării celulozei cu alte poliglucide, lignină, glicoproteine, proteine;

b. macroeterogenitatea datorată formării agregatelor multienzimatice;

c. sinteza mai multor variante ale unui singur produs genetic ca rezultat al translației incorecte, al proteolizei și al glicolizării diferențiate, și al interacțiunii cu componentele mediului de cultură;

d. apariția genelor multiple – caz în care se presupune că produșii genetici au roluri separate în celuloliză.

Enzimele complexului celulozolitic sunt glicoproteine ale căror molecule sunt constituite din glucide 40%, iar 90% din aminoacizii componenți sunt aminoacizi cu sulf.

12.2.2. Specificitatea de substrat a celulazelor

Studiul specificității de substrat trebuie să țină cont de spectrul larg de produși de hidroliză, ce depind în cea mai mare măsură de tipul de celuloză folosit și de prezența componentelor sistemului celulazic.

În mod obişnuit, endoglucanazele sunt inactive faţă de celuloza cristalină cum este cea din bumbac sau Avicel, dar hidrolizează substraturile celulozice amorfe şi solubile cum este carboximetilceluloza (CMC). Celooligoglucidele pot constitui substrat al endoglucanazelor, viteza de hidroliză a lor crescând în funcţie de lungimea lanţului poliglucidic. Atacul acestor enzime este caracterizat de clivarea randomizată a legăturilor β-glicozidice, determinând o scădere rapidă a gradului de polimerizare, proporţională cu viteza de eliberare a glucidelor reducătoare. Acţiunea endoglucanazelor se manifestă mai pregnant la începutul conversiei enzimatice, scăzând pe măsură ce moleculele de substrat devin din ce în ce mai mici. Produşii de reacţie rezultaţi în urma hidrolizei celulozelor amorfe includ glucoză, celobioză şi celodextrine cu dimensiuni variabile.

Spre deosebire de endoglucanaze, exoglucanazele degradează celuloza amorfă prin îndepărtarea consecutivă a câte unei unităţi de celobioză de la capetele nereducătoare ale substratului. Aceste enzime, când acţionează singure, nu atacă aproape deloc bumbacul, pe când gradul de degradare a substratului microcristalin Avicel este de 40% sau chiar mai mare [Coughland M.P., 1992]. Activitatea lor catalitică este cu atât mai redusă cu cât dimensiunile macromoleculelor sunt mari, şi ca urmare rolul lor în stadiul iniţial al hidrolizei enzimatice este redus. Exoenzimele conduc la realizarea unor viteze de eliberare a glucidelor reducătoare mai mare decât ar fi de aşteptat, datorită scăderii gradului de polimerizare sau, acolo unde este cazul, a vâscozităţii soluţiei.

Endoglucanazele şi exocelobiohidrolazele acţionează sinergic pentru hidroliza celulozei cristaline.

Procesul de hidroliză a celulozei este desăvârşit de β-glucozidază, care acţionează prin scindarea celobiozei şi prin îndepărtarea câte unei molecule de glucoză de la capetele nereducătoare ale celodextrinelor cu masă moleculară mică. Activitatea acestei enzime creşte pe măsură ce scade gradul de polimerizare [Coughland M.P., 1992]. Acţiunea β-glucozidazei se manifestă numai asupra celodextrinelor solubile.

Specificitatea mare de substrat a celulazelor se poate obţine în detrimentul vitezei de reacţie. În general, se poate afirma că viteza reacţiilor enzimatice este optimă atunci când, în actul catalitic, este implicată cea mai scăzută cantitate de energie, în timp ce specificitatea este optimizată în condiţiile realizării celui mai stabil complex enzimă-substrat. Ca urmare, datorită specificităţii mari faţă de substrat, orice modificare a structurii sau a accesibilităţii la substrat determină modificări profunde ale cineticii reacţiei de hidroliză.

12.2.3. Adsorbţia celulazelor la suprafaţa celulozei

Adsorbţia celulazelor la suprafaţa celulozei reprezintă mai mult decât un simplu contact fizic dintre enzimă şi substratul său. Astfel, procesul de adsorbţie joacă un rol foarte important în eficientizarea hidrolizei enzimatice a celulozei, în special a celei cu structură cristalină. Capacitatea ezimelor de a fi adsorbite la

suprafața celulozei reprezintă o proprietate importantă a celulazelor, ce variază în funcție de sursa de izolare a acestora.

Procesul de adsorbție a celulazelor la suprafața substratului este condiționat de o serie de factori, printre care [Zhang Y.H.P. și Lynd L.R., 2004]:

- ireversibilitatea parțială a adsorbției celulazelor;
- interacțiile ce au loc între componentele adsorbite ale sistemului celulazic (în special la concentrații mari);
- existența multiplelor site-uri de adsorbție chiar pentru o singură moleculă de celuloză;
- înglobarea celulazei în porii celulozei.

Eficiența adsorbției celulazelor la suprafața celulozei este caracterizată prin coeficientul de partiție (K_p) a enzimei între faza apoasă și suprafața substratului. Acest coeficient este numeric egal cu raportul dintre cantitatea de enzimă adsorbită exprimată în unitatea de masă (de obicei 1g) sau de suprafață (de obicei $1m^2$) a celulozei și concentrația enzimei la echilibru, în condiții de adsorbție izotermă [Klyosov A.A., 1990].

Cercetările au demonstrat o variație în limite foarte mari a coeficientului de adsorbție a endoglucanazelor din diferite surse (tabelul 12.3). Enzimele sunt cu atât mai eficiente cu cât capacitatea de adsorbție este mai mare, ceea ce determină o creștere a acumulării de produși de reacție.

Tabelul 12.3.

Efectul adsorbției endoglucanazelor izolate din diferite surse asupra activității de scindare a celulozei microcristaline [Klyosov A.A., 1990]

Sursa de izolare	Coeficient de adsorbție (l/g)	Conversia substratului %
Trichoderma reesei	0,15	97
Trichoderma longibrachtianum	0,12	92
Geotricum candidum	0,093	88
Aspergillus terreus	0,050	70
Aspergillus niger	0,020	8,5
Aspergillus foetidus	0,015	8

Procesul de adsorbție este identic atât pentru celuloza amorfă cât și pentru cea cristalină, dar este legat de caracteristicile de suprafață ale substratului insolubil.

În general, endoglucanazele se adsorb mai bine decât celobiohidrolazele. În cazul *Trichodermei viride,* adsorbția celulazelor depinde și de temperatura la care are loc procesul, endoglucanazele fiind adsorbite mai bine la 5°C, în timp ce

celobiohidrolazele se leag• de substratul celulozic mai puternic la 50°C [Klyosov A.A., 1990].

Capacitatea celulazelor de degradare a celulozei este corelată cu adsorbţia acestora la suprafaţa substratului. Cu cât enzimele sunt mai puternic legate de celuloza cristalină, cu atât viteza reacţiei enzimatice este mai mare. Când celulazele sunt slab adsorbite, gradul de hidroliză nu depăşeşte 8-9% şi corespunde aproximativ procentului de celuloză amorfă din substrat. Gradul de hidroliză a celulozei amorfe poate fi crescut până la 100% doar prin creşterea concentraţiei enzimei în mediul de reacţie, în timp ce degradarea celulozei microcristaline (în care zonele amorfe sunt practic absente) se poate îmbunătăţi în special prin mărirea capacităţii de adsorbţie la substrat [Klyosov A.A., 1990].

12.2.4. Sinergismul dintre componentele sistemului celulazic

Sinergismul este una dintre cele mai remarcabile proprietăţi ale sistemului polienzimatic celulazic deoarece determină creşterea eficienţei hidrolizei enzimatice, ca urmare a acţiunii comune a două sau mai multe componente ale sistemului celulazic, comparativ cu acţiunea lor singulară.

Ideea sinergismului activităţii componentelor sistemului celulazic a pornit de la constatarea că, experimental, cantitatea de glucide reducătoare eliberate în urma acţiunii întregului complex este net superioară celei însumate în urma acţiunii separate a fiecărei componente a sistemului, atunci când acţionează singură.

Ca urmare a complexităţii sistemului celulazic, sinergismul manifestat în cadrul acestuia este de patru tipuri:

1. sinergism endo-exo între endoglucanaze şi exoglucanaze;
2. sinergism exo-exo între exoglucanaze;
3. sinergism endo-endo între endoglucanaze;
4. sinergism între exoglucanaze şi β-glucozidaze.

1. Sinergism endo-exo

Acest tip de sinergism a pornit de la ideea că nici unul dintre cele două tipuri de enzime, acţionând singure, nu pot realiza hidroliza celulozei cristaline. Însă, într-un amestec cu un anumit raport al componentelor, endoglucanazele scindează legături glicozidice din interiorul polimerului, punând la dispoziţia exoglucanazelor capete nereducătoare de lanţ poliglucidic. De aici se poate trage concluzia că aceste capete de lanţ poliglucidic nu sunt disponibile în cantităţi suficiente astfel încât celobiohidrolazele să-şi manifeste activitatea catalitică în absenţa endoglucanazelor. Pe de altă parte, capetele clivate de endoglucanaze tind să reformeze polimerul în absenţa celobiohidrolazelor [Coughland M.P., 1992].

Acest tip de sinergism depinde în mare măsură de gradul de cristalinitate. Astfel, în cazul celulozei cristaline, sinergismul este foarte intens manifestat, în timp ce pentru celuloza amorfă este mult mai slab şi aproape inexistent atunci când substratul este reprezentat de derivaţi solubili ai celulozei. O serie de experimente

realizate folosind ca substrat carboximetil celuloza (CMC) au condus la concluzia că sinergismul endo-exo nu este un factor determinant al hidrolizei acesteia [Coughland M.P., 1992].

Sinergismul dintre endoglucanaze şi exoglucanaze este cel mai studiat tip de sinergie, deorece este şi cel mai important din punct de vedere cantitativ pentru hidroliza celulozei cristaline.

2. Sinergism exo-exo

Studiile privind acest tip de sinergism au fost inițiate de cercetările întreprinse de Fägerstam şi Petterson care au purificat două celobiohidrolaze CBHI şi CBHII din *Trichoderma reesei*, şi care acționează împreună pentru solubilizarea bumbacului. Acest sinergism reflectă de fapt asimetria moleculelor de celuloză, conferită de dispunerea spațială a moleculelor de glucoză rotite cu 180° una față de cealaltă. Ca urmare, CBHI scindează una dintre cele două legături glicozidice, diferite din punct de vedere stereospecific, iar CBHII o atacă pe cealaltă.

3. Sinergism endo-endo

Acest tip de sinergism se manifestă între două endoglucanaze, având semnificație deosebită pentru hidroliza celulozei cristaline. O contribuție importantă la elucidarea acestui tip de sinergism au adus-o cercetările realizate de Rabinovich şi colaboratorii, care au demonstrat că una dintre endoglucanazele sintetizate de *Trichoderma viride* este adsorbită puternic, în timp ce cealaltă este slab adsorbită, diferența între constantele lor de partiție între suprafața celulozei şi faza apoasă fiind de aproape zece ori (1,3 l/g şi 0,15 l/g). Concluzia ce se desprinde este că zonele subtratului în care acționează enzimele puternic şi slab adsorbite sunt diferite. Astfel, adăugarea de endoglucanaze slab adsorbite pentru hidroliza celulozei, degradate în prealabil de enzima puternic adsorbită, conduce la o creştere semnificativă a vitezei de reacție, cât şi a gradului de conversie a celulozei microcristaline (mai mult de 60%). Experimentele au arătat că viteza de hidroliză a combinației de endoglucanaze slab şi puternic adsorbite este de 6 până la 20 de ori mai mare decât în situația în care s-au folosit doar endoglucanaze puternic adsorbite [Klyosov A.A., 1990].

O explicație a eficienței acestui tip de sinergism ar fi ipoteza că enzimele puternic adsorbite se leagă la celuloză în zonele în care structura sa cristalină este deranjată, determinând o defibrilare. Enzimele puternic adsorbite pot penetra apoi aceste regiuni intercristaline şi pot deschide astfel noi zone de atac pentru enzimele slab adsorbite.

4. Sinergism între exo- endo- şi β-glucozidaze

Sinergismul acesta se explică prin capacitatea β-glucozidazelor de a transforma rapid în glucoză celobioza rezultată ca urmare a acțiunii componentelor endoglucanazice şi exoglucanazice. Prin acțiunea lor, β-glucozidazele determină eliminarea inhibiției produsă de celobioză, care este un inhibitor al hidrolizei enzimatice mai puternic decât glucoza.

În concluzie, acțiunea simultană a componentelor sistemului celulazic determină creşterea vitezei de formare a compuşilor solubili şi implicit a gradului de conversie a celulozei, comparativ cu situația înregistrată atunci când enzimele

acţionează separat. Efectul sinergic depinde de formele multiple ale componentelor celulolitice, de raportul în care acestea se găsesc în sistemul enzimatic, de sursa de izolare a celulazelor şi de substratul celulozic (amorf sau cristalin).

12.2.5. Aspecte ale mecanismului general de degradare a celulozei

Structura complicată a celulozei, complexitatea sistemului celulazic şi sinergismul dintre componentele individuale ale acestuia complică extrem de mult studiile privind mecanismul de acţiune al celulazelor. De aceea, în prezent, nu există încă o reprezentare unitară asupra modului şi acţiunii complexelor enzimatice implicate în celuloliză.

Dacă se consideră mecanismul hidrolizei enzimatice a celulozelor native în ansamblu sau se poate afirma că acesta comportă două etape distincte:

1. Etapa hidratantă, în care se scindează legăturile de hidrogen, etapa neimplicand şi modificările structurilor catenare şi monomerice ale celulozei, legătura β-glicozidică nefiind afectată.

2. Etapa hidrolitică, în care are loc scindarea legăturile β-glicozidice, procesul fiind destructiv în raport cu acestea.

Până la nivelul anilor `80, cercetările întreprinse pentru elucidarea mecanismului degradării substratelor celulozice s-au limitat la evidenţierea modului hidrolitic de atac enzimatic.

Primul model de degradare a celulozei a fost dezvoltat de Reese E.T. şi colaboratorii (1950), care propun conceptul conform căruia celuloliza se realizează în trei etape. În prima etapă, fibrele de celuloză nativă (bumbac sau Avicel) sunt scindate în fragmente sub acţiunea enzimei C_1. În etapa a doua, devine activă enzima C_x, care scindează aceste fragmente în oligomeri, hidrolizaţi apoi în etapa a treia, de către β-glucozidază, încheindu-se în acest mod descompunerea celulozei cu formare de β-D-glucoză.

Cercetările lui Spano (1975) completează modelul lui Reese, atribuind enzimei C_1 rol de „decristalizare" a fibrelor de celuloză. De asemenea, el a demonstrat că C_x constă de fapt într-un amestec de exo-β-1,4-glucanaze şi endo-β-1,4-glucanaze, ce atacă sinergic derivaţii solubili ai celulozei.

În 1975, Halliwell şi Griffin au izolat componenta C_1 din *Trichoderma koningii* şi au definit-o ca fiind o β-1,4-celobiohidrolază.

Începând din anii '80, o serie de lucrări ştiinţifice abordează etapa premergătoare hidrolizei enzimatice propriu-zise, încercând să fundamenteze mecanismele de formare a fibrelor scurte, segmentarea sau destratificarea.

Studiile de degradare a celulozei intermediată de fungi au relevat existenţa unor etape oxidative în derularea etapei hidratante. Cercetările întreprinse de Vahri (1982, 1983, 1985) au demonstrat că primul pas în degradarea bumbacului de către *Trichoderma reesei* este apariţia fibrelor scurte, insolubile, când în mediul de cultură se formează acidul gluconic şi acidul celobionic. Formarea fibrelor scurte

nu apare în condiţii stricte de anaerobioză. Astfel, s-a ajuns la concluzia că în stadiul iniţial al degradării bumbacului are loc o oxidare, care produce modificări în structura celulozei. Aceste modificări nu sunt materializate prin formare de glucide solubile, ci fac substratul mult mai accesibil atacului endoglucanazei. De fapt, se presupune că produşii iniţiali ai oxidării sunt lactonele, care, instabile fiind, sub acţiunea lactonazelor produc acizii liberi observaţi. Enzima care catalizează oxidarea este celobiozoxidaza şi este considerată parte a sistemului celulazic al unor fungi ca *Trichoderma reesei, Myrotecium verrucaria, Poliporus adustus.* Afirmaţia se sprijină pe faptul că degradarea bumbacului cu aceşti fungi, desfăşurată în atmosferă de azot, s-a situat la jumătatea celei realizate în atmosferă de oxigen sau în aer.

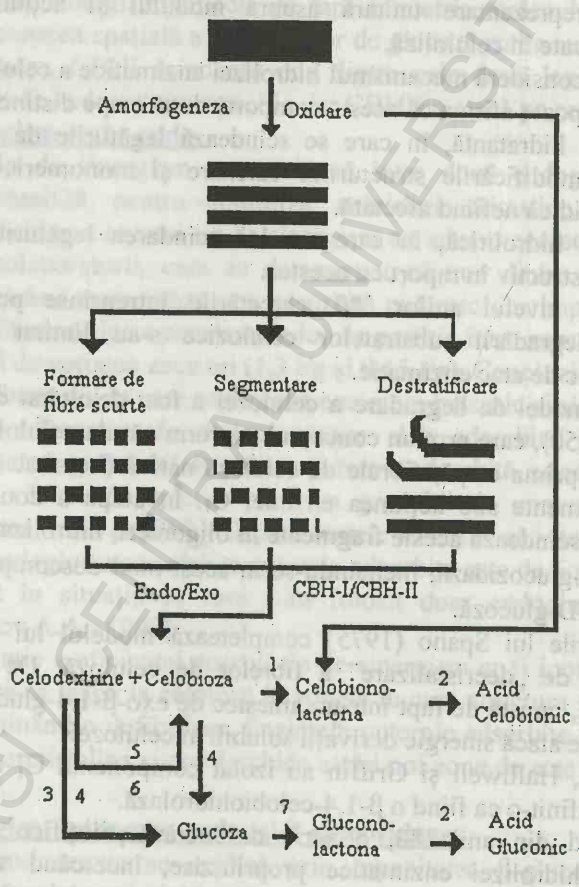


Figura 12.9. Mecanism posibil de degradare a celulozei de către fungi.
Enzimele numerotate sunt: 1-celobiozoxidaza; 2-lactonaza; 3- exoglucohidrolaza; 4-β-glucozidaza; 5-endoglucanaza; 6-exocelobiohidrolaza; 7-glucozoxidaza [Coughland M.P., 1992].

În 1988, Coughland şi Ljungdahl au propus o schemă de degradare a celulozei, prezentată în figura 9, care nu trebuie privită ca o serie de evenimente separate, ci ca un proces continuu de conversie a polimerului cristalin la compuşi solubili, cu masă moleculară mai mică.

Conform acestei scheme, în primele stadii ale degradării are loc formarea fibrelor scurte, segmentarea sau destratificarea, când se formează acizi liberi, fără a se elibera glucide reducătoare. Totalitatea acestor transformări fizice, prin care substratul recalcitrant devine susceptibil acţiunii enzimelor hidrolitice, a fost denumită de Coughland "amorfogeneză" [Coughland M.P., 1992].

Procesul de formare a fibrelor scurte poate fi de natură oxidativă, după cum s-a arătat mai sus, sau, după alţi autori, poate fi atribuit unei hidrolaze. În cazul *Trichodermei reesei,* acest rol poate fi îndeplinit de o endoglucanază, care, datorită dimensiunilor mici (masă moleculară 12000) ar putea pătrunde printre fibrilele de celuloză. Este posibil ca în acest proces să fie implicate atât reacţii oxidative, cât şi reacţii hidrolitice.

Segmentarea ar implica atacul simultan al mai multor lanţuri poliglucidice din fibrele de celuloză, printr-un atac enzimatic randomizat [Marchessault, R. H. si colab., 1983]. Folosind microscopia electronică, Chanzy (1984) a arătat că celobiohidrolaza I sintetizată de *Trichoderma reesei* se leagă la întâmplare în lungul lanţurilor de celuloză. Pentru ca segmentarea să aibă loc, aceste legări randomizate ar trebui să fie însoţite de hidroliza legăturilor glicozidice. Este de asemenea necesar să existe şi alte enzime (printre care şi unele de tip oxidativ) în mediu, care să prevină reformarea acestor legături.

Un al treilea mecanism ce ar putea opera în primele stadii ale bioconversiei fibrelor de celuloză este destratificarea. Aceasta presupune ca degradarea să fie iniţiată prin desprinderea strat cu strat de pe fibrele de celuloză, înaintea solubilizării lanţurilor poliglucidice astfel eliberate [Marchessault, R. H. si colab., 1983].

Trebuie menţionat că formarea fibrelor scurte, segmentarea şi destratificarea nu sunt procese ce au loc în mod exclusiv. De exemplu, dacă fibrilele înlăturate în procesul de destratificare sunt clivate în puncte întâmplătoare, pot da naştere la fibre scurte. Ulterior, sau chiar în timpul procesului, diferitele componente ale întregului sistem hidrolitic interacţionează pentru a realiza degradarea lanţurilor celulozice. Este un fapt dovedit că, în cea mai mare parte, aceste interacţii sunt sinergice.

Produşii de degradare obţinuţi în urma acestor etape incipiente sunt celodextrinele şi celobioza. Abia din acest moment pot intra în acţiune exocelulazele şi endocelulazele. Exocelulazele vor îndepărta resturi de glucoză, începând de la capătul nereducător al lanţului poliglucidic al celodextrinelor. La fel acţionează şi β-glucozidaza, numai că aceasta preferă lanţurile oligoglucidice mai scurte, în timp ce exoglucanazele preferă lanţurile de substrat mai lungi. Endoglucanazele acţionează în interiorul lanţurilor de celodextrine, până la formarea celobiozei. β-Glucozidaza hidrolizează celobioza cu formare de glucoză. Un rol important în acest stadiu îl au şi enzimele oxidative, respectiv celobiozoxidaza şi lactonazele (fig. 4).

12.3. PRETRATAMENTE APLICATE MATERIALELOR LIGNOCELULOZICE

Rezistenţa celulozei native la hidroliza enzimatică se datorează parţial proprietăţilor sale intrinseci şi parţial asocierii sale cu lignina şi cu alte poliglucide ca hemiceluloza şi pectina, într-o matrice ce împiedică accesul enzimelor celulolitice. De aceea, utilizarea materialelor lignocelulozice impune ca etapă premergătoare hidrolizei enzimatice, efectuarea unui pretratament care să faciliteze accesul celulazelor.

Termenul de pretratament defineşte un proces prin intermediul căruia biomasa lignocelulozică, în forma sa nativă, este transformată astfel încât să permită hidroliza enzimatică.

Rolul pretratamentului este de scădere a gradului de cristalinitate a celulozei, de creştere a suprafeţei sale de acces şi de scindare şi îndepărtare a cât mai mult posibil din componentele necelulozice (în mod deosebit a ligninei).

Degradarea celulozei s-a dovedit a fi invers proporţională cu cristalinitatea substratului celulozic. Totuşi, indicele de cristalinitate nu reprezintă un factor determinant în evaluarea susceptibilităţii celulozei la degradarea enzimatică. Astfel, gradul de îmbibare, structura fibrilară şi volumul porilor pot constitui de asemenea factori importanţi [Marchessault, R. H. si colab., 1983].. Volumul total al porilor celulozei înmuiate în apă reprezintă suma volumelor unui număr mare de spaţii mici capilare (cu diametrul până la 200Å), existente între microfibrilele adiacente şi unui număr mai mic de spaţii capilare dar mai mari (cu diametre ce variază între 200Å şi 1000Å), ce se găsesc la suprafaţa externă a legăturilor de microfibrile.

De aceea, cele mai eficiente pretratamente aplicate materialelor de natură celulozică sunt acelea care determină o creştere a volumului porilor, facilitând accesul celulazelor la microfibrilele din interior şi cele care determină o scădere a dimensiunilor particulelor sau a gradului de polimerizare.

Compoziţia chimică diferită a celulozelor din surse biologice variate, diversitatea sistemelor celulazice produse de numărul mare de microorganisme şi posibilităţile vaste de valorificare a acestor materiale, au condus la elaborarea unui număr mare de pretratamente care s-ar putea grupa în pretratamente mecanice, chimice, fizice (altele decât cele mecanice) şi biologice.

12.3.1. Pretratamente mecanice

Acest tip de pretratament se execută în scopul creşterii suprafeţei de acces a enzimelor complexului celulozolitic la fibrilele celulozice.

Pretratamentele mecanice se aplică în general materialelor lignocelulozice destinate înglobării în furaje.

Prin prelucrare mecanică se pot realiza [Pană C.O., 2000]:

- măruntirea (măcinarea); se efectuează cu mori specifice fibroase, iar mărimea predominantă a particulelor materialului celulozic obţinut este sub 10 mm;
- tocarea; se efectuează cu combine sau tocători, iar mărimea obişnuită a particulelor este de 10-60 mm.

Aplicarea procedeelor menţionate conduce la creşterea gradului de consumabilitate, reducerea consumului de energie pentru mărunţire în tubul digestiv, creşterea coeficienţilor de digestibilitate ai celulozei în special şi se creează posibilitatea realizării unor amestecuri cu alte nutreţuri.

În funcţie de dotarea tehnică, se mai pot aplica şi alte procedee mecanice [Pană C.O., 2000]:

- defibrarea; se practică de regulă concomitent cu tocarea şi are ca efect sfâşierea în lung a cuticulei silicoase de la tulpinile de coceni de porumb;
- zdrobirea; se efectuează în cazul ciocălăilor sau a ştiuleţilor de porumb, când se intervine cu utilaje specifice (zdrobitoare);
- presarea; se practică în condiţiile granulării paielor, când pentru compactarea lor se acţionează cu presiuni de 100-500 kg forţă/cm^2, în condiţii de temperatură de 90-120^{0}C la nivelul matriţei.

Dintre pretratamentele mecanice mai sus prezentate, cea mai eficientă este mărunţirea. Aceasta se poate realiza folosind mori cu bile, mori cu valţuri, mori cu ciocănele, mori vibratorii şi mori coloidale.

Pretratamentele mecanice pot conduce la scăderea cu 75% a gradului de polimerizare a celulozei şi la o suprafaţă specifică de trei ori mai mare decât cea iniţială (tabel 4).

Eficienţa pretratamentelor mecanice este relativ scăzută, în primul rând deoarece lignina rămâne ataşată la celuloză şi apoi din considerente energetice. Cercetările au demonstrat că pentru reducerea de 8 ori a dimensiunii particulelor se consumă o energie de 28 de ori mai mare [Klyosov A.A., 1990].

Tabelul 12. 4.

Efectul măcinării asupra structurii fibrelor de bumbac [Klyosov A.A., 1990]

Durata măcinării (min)	Dimensiunea particulelor (μm)	Gradul de polimerizare	Suprafaţa specifică (m^2/g)	Gradul de cristalinitate a preparatului uscat (%)
0	Fibre	1100	0,17	85
2	32	870	0,27	65
2,5	22	420	0,27	-
5	19	510	0,28	-
7	19	490	0,32	-
10	19	430	0,30	30
15	18	320	0,45	-
20	17	280	0,54	25

12.3.2. Pretratamente fizice

12.3.2.1. Pretratamente cu vapori

Pretratarea cu vapori, așa numita "steam explosion", era considerată în 1990 ca fiind cel mai promițător pretratament pentru exploatarea biomasei agricole prin bioconversie (Foscher, 1990). Procedeul se bazează pe hidroliză rapidă, la temperaturi înalte (180-240°C), prin injecție de vapori sub presiune. Are loc o hidroliză a hemicelulozelor, dar și o destructurare intensă a fibrelor de celuloză datorită eliberării explozive de produși, ce se traduce printr-o creștere importantă a suprafeței accesibile. În funcție de optimizarea condițiilor de pretratament, se poate obține chiar o depolimerizare a ligninei, care devine aproape solubilă în soluții diluate de hidroxid de sodiu, putând fi recuperată ulterior prin acidifiere.

Recent [Tengborg C. și colab., 2001] s-a încercat chiar pretratarea deșeurilor de lemn de esență moale prin acest procedeu, pretratamentul făcându-se la 215°C, timp de 3 minute.

Pe lângă faptul că ridică probleme privind aparatura necesară și consumul ridicat de utilități (energie electrică, abur), această metodă nu este folosită pe scară largă deoarece eficacitatea ei este inferioară pretratării alcaline. Rezultate mai bune au fost obținute la cuplarea acestui pretratament cu cel acid [Fox D.J. și colab., 1989].

12.3.2.2. Pretratamente prin iradiere

Prin iradiere se urmărește depolimerizarea moleculelor de celuloză și lignină și distrugerea unor legături ale ligninei cu alți componenți. În acest scop, s-a experimentat iradierea cu radiații gamma și iradierea cu electroni.

Acest tip de pretratament nu este eficient atunci când se aplică celulozei pure, dar accelerează viteza hidrolizei enzimatice (de 1,5 până la 3 ori) a unor materiale lignocelulozice cum ar fi paiele de grâu și orz.

12.3.3. Pretratamente chimice

Pretratamentele chimice au ca scop îndepărtarea ligninei și a celorlalte componente necelulozice și modificarea structurii cristaline a celulozei.

Se efectuează cu substanțe chimice (alcalii, acizi, agenți oxidanți), care acționând asupra complexului ligno-celulozic, facilitează atacul enzimelor și al microorganismelor.

12.3.3.1. Pretratamente alcaline

Hidroxid de sodiu

Până în prezent, pretratamentele cu NaOH s-au aplicat mai mult pentru îmbunătățirea digestibilității materialelor lignocelulozice destinate furajării animalelor, decât ca etapă pregătitoare a hidrolizei enzimatice. Tratarea cu NaOH

diluat a materialelor lignocelulozice determină gonflarea acestora, ce are ca urmare creşterea suprafeţei specifice a celulozei şi distrugerea structurii ligninei.

Pretratamentele cu NaOH au efect cert asupra speciilor lemnoase şi asupra paielor, dar nu afectează aproape deloc bumbacul, cantitatea de glucide reducătoare fiind aproape neschimbată în urma tratamentului [Fan L.T. şi colab., 1981].

În practica curentă a devenit obişnuită utilizarea NaOH în doză de 5-6%. Aplicarea acestor tratamente se poate face:

- prin imersiune, respectiv prin scufundarea într-un bazin a materialului lignocelulozic, într-o soluţie alcalină cu concentraţie de 3,5%; se pregătesc circa 10 l soluţie pentru 1 kg paie (metoda Beckmann);
- prin spreiere; se stropeşte materialul lignocelulozic cu o soluţie alcalină concentrată (20-25% NaOH), în cantitate de 0,5-3 l soluţie pentru 100 kg paie;
- rezultate superioare se obţin cu NaOH 8-12%, menţinându-se la 80°C, timp de 30-60 minute [Jurcoane S., 2000].

Pretratamentele chimice cu NaOH, deşi au eficienţa dovedită asupra detaşării ligninei şi a gonflării fibrelor de celuloză, ridică probleme severe de spălare corectă şi neutralizare a reziduului solid şi de eliminare a reactivilor în mediu.

Amoniac

Tratarea paielor cu NH_3 îmbunătăţeşte digestibilitatea acestora, acţionând ca agent de gonflare puternică şi de modificare a structurii cristaline a celulozei. Folosirea NH_3 poate conduce la creşterea de trei ori a cantităţii de glucide reducătoare eliberate. Waiss a obţinut o îmbunătăţire cu 10% a digestibilităţii enzimatice, după tratarea cu 5% NH_3, la temperatura camerei [Fan L.T. şi colab., 1981].

Amonizarea furajelor se poate efectua:

- cu NH_3 anhidru gazos, prin injectarea cu utilaje specifice a amoniacului în sire împachetate în folie de polietilenă, în doză de 30 kg NH_3/t; efectul se obţine după 4-6 săptămâni vara şi 8 săptămâni iarna.
- prin umectarea furajelor cu ape amoniacale, care au un conţinut minim de 17% N. Doza este de 12 l/100 kg, practicându-se o stropire în straturi succesive până se formează sira [Jurcoane S., 2000].

Sulfit de amoniu

Sulfitul de amoniu a fost utilizat în special în procesarea celulozei pentru obţinerea hârtiei, procedeul fiind modificat de Clarke şi Dyer pentru îmbunătăţirea digestibilităţii materialelor lignocelulozice destinate hranei animalelor. Masa de celuloză este tratată cu $(NH_4)_2SO_4$ la temperatură şi presiune ridicată, rezultând o creştere a conţinutului de lignină reziduală de 15% [Fan L.T. şi colab., 1981].

12.3.3.2. Pretratamente acide

Acizii servesc mai mult drept catalizatori ai hidrolizei enzimatice decât ca agenţi de pretratare. Pretratarea cu acizi minerali concentraţi determină o gonflare puternică a celulozei, ce conduce la solubilizarea ei totală.

Acid sulfuric

Acest tip de tratare este folosit mai ales în scopul valorificării celulozei pentru obținerea de etanol și se bazează pe diferența de rezistență la hidroliza acidă dintre hemiceluloze și celuloză. Pentru hidroliză se utilizează, în general, acid sulfuric în concentrații de 1-3%. Temperatura și durata tratamentului diferă în funcție de tehnologia utilizată: fie la 200°C, timp de 10 s, fie la 120-130°C, timp de 15-30 de minute [Popa O. și colab., 1991].

Numeroase deșeuri agricole au fost pretratate folosind concentrații diferite de H_2SO_4, timp și temperaturi de tratare variate.

Eliberarea de glucide din deșeuri de trestie de zahăr a crescut la 23%, prin tratarea cu H_2SO_4 50%, la 121°C, timp de 15 minute, urmată de diluarea acidului la concentrația de 1%, timp de 15 minute, la 121°C [Fan L.T. și colab., 1981].

Paiele de grâu tratate cu H_2SO_4 3%, la 130°C, timp de 4 ore și folosite ca sursă de carbon în mediul de cultură pentru *Cellulomonas sp.*, nu au determinat modificări esențiale în creșterea acestuia.

Tsao și colaboratorii au pretratat deșeuri lignocelulozice cu H_2SO_4, separând fracția pentozică cu acid slab. Reziduul a fost uscat și apoi tratat cu H_2SO_4 concentrat (70-80%) pentru dizolvarea celulozei. Celuloza obținută a fost amorfă, putând fi ușor zaharificată prin hidroliză enzimatică. Aplicând acest procedeu pentru ciocălăii de porumb, eliberarea glucidelor a crescut la 35-49% [Fan L.T. și colab., 1981].

Acid clorhidric

Paie de orz au fost pretratate cu HCl 3%, la 130°C, timp de 4 ore și utilizate apoi în mediul de cultură pentru *Cellulomonas sp.*; creșterea a fost inferioară celei obținute pentru proba martor.

Acid fosforic

Pretratamentul s-a făcut folosind H_3PO_4 cu concentrația de 85%, la 2°C, pe parcursul a două perioade de timp, respectiv 10 minute și 2 ore. Substratul obținut a fost puternic gonflat și amorf, fiind hidrolizat enzimatic în proporție de 80% [Fan L.T. și colab., 1981].

S-a constatat că o creștere a concentrației de H_3PO_4 determină creșterea gradului de gonflare a celulozei. Mai mult, s-a observat că există o dependență liniară între viteza inițială a reacției de hidroliză și suprafața accesibilă a celulozei gonflate cu H_3PO_4 [Fan L.T. și colab., 1987].

Deși s-au dovedit a fi eficiente, pretratamentele acide au o serie de dezavantaje. Inconvenientul major al metodelor acide de pretratament este instabilitatea glucidelor în mediu acid, la cald ele degradându-se la compuși aldehidici, de tipul furfurolului și hidroximetilfurfurolului, ce sunt toxici și inhibă procesele fermentative. La aceasta se adaugă consumul ridicat de reactivi și energetic, cât și problemele de neutralizare a materialului lignocelulozic și a apelor reziduale. Alte impedimente vizează probleme de manipulare și de corodare a instalațiilor.

12.3.3.3. Pretratamente cu agenţi oxidanţi

Acest tip de pretratamente are ca scop delignificarea prin oxidarea ligninei şi eliberarea celulozei în vederea hidrolizei enzimatice. Pentru aceasta, se folosesc o serie de agenţi oxidanţi: dioxid de clor, oxizi de azot, dioxid de sulf, ozon, acid peracetic, peroxid de hidrogen.

Dioxid de clor

Dioxidul de clor este un agent oxidant folosit în special în industria celulozei şi hârtiei, care îl utilizează ca soluţie în acid acetic pentru solubilizarea ligninei.

Trecând ClO_2 printr-un strat de paie de grâu uscate şi măcinate, Sullivan a îmbunătăţit digestibilitatea acestora cu 43% faţă de materialul netratat [Fan L.T. şi colab., 1981].

Oxizi de azot

Pentru pretratarea materialelor lignocelulozice s-a folosit NO în raport 100:5 cu adiţie de oxigen, tratamentul realizându-se la 25°C, timp de 24 de ore. Dioxidul de azot care rezultă reacţionează cu apa, formând acid azotic capabil să oxideze şi să degradeze lignina [Fan L.T. şi colab., 1987].

Ozon

Ozonul poate fi o alternativă bună pentru degradarea ligninei, deoarece cantitatea de compuşi toxici rezultaţi este foarte redusă. El poate fi utilizat pentru pretratarea unor deşeuri agricole, şroturi, rumeguşuri, determinând creşteri ale vitezei de hidroliză enzimatică de cinci ori, atunci când 60% din lignină este îndepărtată.

Folosind un pretratament cu ozon pentru paiele de grâu, Binder a obţinut o creştere semnificativă a biodegradabilităţii acestora.

12.3.4. Pretratamente biologice

Pretratamentele biologice se realizează folosind microorganisme capabile să înlăture lignina şi hemicelulozele din materialele de natură lignocelulozică.

Hatakka (1983) a folosit putregaiul alb pentru a trata paie de grâu şi a constatat că în timp de cinci săptămâni, 35% din ele au fost transformate în glucide reducătoare. Din păcate, s-a constatat că aceste microorganisme degradează şi ceilalţi constituenţi ai materialelor lignocelulozice şi, ca urmare, nu folosesc lignina ca substrat de creştere, făcând imposibilă îndepărtarea selectivă a ligninei.

Pretratarea biologică a fost testată şi pentru deşeuri de lemn, folosindu-se tulpini de *Phanerochaete sp,* acest microorganism fiind considerat reprezentativ pentru biodegradarea ligninei.

Pentru pretratarea paielor de grâu s-a utilizat *Pleurotus ostreatus,* dar după 10-20 de zile, delignificarea parţială nu a condus la îmbunătăţirea semnificativă a gradului de hidroliză enzimatică, acesta crescând însă de 4-5 ori după 50 de zile de cultivare [Klyosov A.A., 1990].

În prezent, pretratamentele biologice se aplică deşeurilor lignocelulozice în

procesul de fabricare a așa-numitei "hârtii ecologice".

Deși pretratamentele biologice necesită cantități scăzute de energie și reactivi și nu ridică probleme majore de mediu, totuși nu pot fi utilizate pe scară largă datorită timpului mare de realizare a delignificării.

12.3.5. Pretratamente combinate

Deoarece toate tipurile de pretratament prezentate anterior au eficiență limitată și prezintă o serie de dezavantaje, în ultimii ani cercetările s-au îndreptat spre cuplarea a două sau mai multe pretratamente, care să conducă la eficiență sporită și la diminuarea efectelor secundare.

Astfel, un pretratament mecanic aplicat înaintea altor tipuri de pretratamente crește eficiența acestora cu cel puțin 20-25%.

În condițiile în care pretratarea cu aburi este cuplată cu un pretratament chimic (amoniac, hidroxid de sodiu, bioxid de sulf, bioxid de carbon), poate să conducă la conversie enzimatică până la glucoză de 100%.

Pretratamente alcalino-peroxidice

Cuplarea unui tratament alcalin cu unul oxidativ acționează prin scindarea legăturilor dintre lignină și celuloză și totodată prin degradarea ligninei, ea acționând ca inhibitor în hidroliza enzimatică. Tratamentele oxidative au ca țintă principală degradarea ligninei (dificil de realizat datorită legăturilor puternice intramoleculare, în special cele de tip bifenil), în timp ce cele alcaline au ca efect clivarea legăturilor dintre celuloză și lignină.

Rezultatele primelor cercetări ce au vizat cuplarea unui tratament alcalin cu unul peroxidic, în scopul îmbunătățirii hidrolizei enzimatice, au fost publicate de Gould. Astfel, aceste cercetări au arătat că soluții diluate alcalino-peroxidice pot îndepărta până la 50% din lignina prezentă în unele materiale lignocelulozice, rezultând un reziduu insolubil, bogat în celuloză, ce poate fi transformat mult mai eficient în glucoză [Gould, J.M., 1984, 1985].

Ulterior, Patel și Bhatt, au aplicat acest tip de pretratament alcalino-peroxidic în scopul creșterii digestibilității paielor de orez folosite în hrana rumegătoarelor, realizând o diminuare semnificativă a conținutului în hemiceluloză și lignină și o creștere a conținutului în celuloză a reziduului insolubil, de la 47% la 68%. Concentrația de NaOH testată a fost de maxim 3%, cea a peroxidului de hidrogen de maxim 4,5%, iar temperatura nu a depășit 50°C. Folosind paiele de orez, pretratate în aceste condiții, în hrana rumegătoarelor, digestibilitatea *in vivo* a crescut de la 56% la 77% [Patel M.M., Bhatt R. M., 1993].

Cercetări urmând aceeași direcție au desfășurat și Kerley, Fahey și Berger (1987), Lewis și Fahey (1989).

Sun și colaboratorii (2004) au pretratat alcalino-peroxidic mai multe materiale lignocelulozice, folosind H_2O_2 2%, la pH 11,6, timp de 16 ore, la 45°C. Ca urmare, degradarea ligninei a fost de 87,3% pentru paie orz, 70,9% pentru paie de grâu, 85,7% pentru paie de orez și 88,6% pentru paie de secară.

Experiențele realizate de Fang J.M. și colaboratorii (2000) au demonstrat

că pretratarea alcalino-peroxidică a paielor de orez a condus la obţinerea unei delignificări mai mare de circa zece ori decât în cazul în care s-a folosit doar soluţia alcalină, cu aceeaşi concentraţie (87,9% faţă de 7,4%).

În pretratamentul alcalino-peroxidic, agentul oxidant este cel care degradează lignina, în timp ce alcaliile hidrolizează legăturile dintre lignină şi glucide. Cuplarea pretratamentelor oxidative cu cele alcaline ar trebui să conducă la eficienţă sporită şi deci, la obţinerea unui reziduu insolubil mai bogat în celuloză.

12.4. DEGRADAREA MICROBIANĂ A MATERIALELOR LIGNOCELULOZICE

12.4.1. Microorganisme implicate în degradarea materialelor lignocelulozice

Degradarea microbiană a biomasei celulozice implică trei etape: producerea de celulaze, hidroliza celulozei şi a celorlate componente poliglucidice ce o însoţesc şi valorificarea produşilor de reacţie rezultaţi.

Microorganismele care degradează celuloza sunt abundente, ele fiind omniprezente în natură, incluzând fungi, bacterii şi actinomicete, aerobe şi anaerobe, mezofile şi termofile.

Cei mai activi producători ai compexului enzimatic celulozolitic aparţin fungilor filamentoşi: *Trichoderma reesei, Trichoderma viride, Trichoderma lignorum, Trichoderma konigii, Trichoderma longibrachtianum Sporotrichum thermophile, Myrothecium verucaria, Penicillium expansum, Penicillium iriensis, Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus.*

În literatura de specialitate sunt citate cel puţin 60 de specii diferite de fungi celulolitici. Totuşi, trebuie menţionat că, deşi există numeroşi fungi care degradează derivaţii solubili ai celulozei, ca de exemplu carboximetilceluloza, numai câţiva dintre ei pot produce extracelular un sistem celulazic complet, capabil să hidrolizeze celuloza cristalină până la glucide solubile.

Sistemul celulazic produs de bacterii se deosebeşte de cel sintetizat de fungi, prin faptul că β-glucozidaza este întotdeauna intracelulară. Nu toate bacteriile sintetizează însă β-glucozidază, metabolizarea celobiozei fiind realizată prin intermediul celobiofosforilazei. Bacteriile producătoare de celulază pot fi aerobe (genurile *Cellulomonas, Bacillus, Pseudomonas, Cytophaga, Thermonospora, Streptomyces, Thermoactinomyces, Chaetomium*) sau anaerobe (genurile *Clostridium sp., Ruminococcus sp). Clostridium thermocellum* reprezintă un model celulazic intens studiat în care, enzimele sistemului sunt organizate într-o

suprastructură distinctă numită celulozom, situat la suprafața celulei bacteriene [Lynd L.R. şi colab., 2002].

Există diferențe structurale între sistemele celulazice produse de diverse microorganisme. În tabelul 5 sunt prezentate o serie de microorganisme producătoare de celulaze care au fost evaluate şi care vizează evidențierea componentele sistemului polienzimatic celulolitic sintetizat [Israel F., teză de doctorat, 2005].

În general, microorganismele producătoare de celulaze sunt capabile să sintetizeze în cantități mai mici sau mai mari şi alte enzime care contribuie, alături de celulaze, la degradarea substraturilor de natură lignocelulozică cu compoziție şi structură complexă. Printre acestea se numără şi xilanaza, β-xilozidaza, glucomanaza, galactomanaza, acetilesteraza, glucuronidaza, lactaza, lactonaza, o serie de proteaze şi amilaze, unele oxidoreductaze [Duff S. J. B. şi Murray W.D., 1996].

Tabelul 12.5.

Microorganisme producătoare de celulaze

Nr.	Microorganism	Tip de enzimă
1	*Agaricus bisporus*	endoglucanaze, exoglucanaze
2	*Aspergillus niger*	endoglucanaze, β-glucozidaze
3	*Aspergillus terreus*	endoglucanaze, exoglucanaze, β-glucozidaze
4	*Bacillus circulans*	endoglucanaze, β-glucozidaze
5	*Botrytis cinerea*	β-glucozidaze
6	*Cellulomonas flavigena*	endoglucanaze, exoglucanaze
7	*Fusarium oxysporum*	endoglucanaze, exoglucanaze, β-glucozidaze
7	*Penicillium occitanis*	endoglucanaze, exoglucanaze, β-glucozidaze
8	*Sporotrichum thermophile*	endoglucanaze, exoglucanaze, β-glucozidaze
9	*Streptomyces reticuli*	β-glucozidaze
10	*Thermonospora fusca*	endoglucanaze,
11	*Trichoderma reesei*	endoglucanaze, exoglucanaze, β-glucozidaze
12	*Trichoderma viride*	endoglucanaze, exoglucanaze, β-glucozidaze
13	*Trichoderma longibrachiatum*	endoglucanaze, exoglucanaze

Pentru ca un microorganism să fie utilizat pe scară largă pentru degradarea celulozei, trebuie să îndeplinească o serie de condiții:

- să nu fie patogenic;
- să manifeste o bună specificitate pentru substrat;
- să sintetizeze un complex celulazic cât mai complet;
- să aibă potenţial mare de bioconversie;
- să poată fi manipulat prin tehnici curente de mutageneză;
- să fie lipsit de endotoxine (caracteristică esenţială pentru aplicaţiile medicale şi alimentare)
- să nu producă proteaze care să degradeze proteinele, atât intracelular cât şi extracelular, conducând în final la forme enzimatice inactive;
- să nu necesite condiţii extreme de cultivare (temperatură, pH).

12.4.2. Degraădarea celulozei cu tulpini de *trichoderma viride*

Biodegradarea celulozei utilizând tulpini de *Trichoderma reesei* şi *Trichoderma viride* a fost studiată intens, constituind model de studiu al sintezei celulazice şi al mecanismului de acţiune al acestor enzime. Pentru îmbunătăţirea performanţelor de biosinteză a enzimelor celulozolitice s-au practicat şi diverse procedee de mutageneză, folosind ca agenţi mutageni nitrozoguanidina, nitrozoetiluree, dietilsulfat, nitrit de sodiu, radiaţii UV sau γ [Esterbauer H. şi colab., 1991]. Aceste procedee au vizat în special obţinerea de tulpini mutante rezistente la represia catabolică, ce prezintă o mare importanţă practică, deoarece complexul enzimatic implicat în hidroliza celulozei, produs de *Trichoderma reesei* şi *Trichoderma viride,* este represibil prin produsul final glucoză. Această represie, cât şi activitatea enzimatică specifică scăzută a sistemelor celulazice sintetizate de tulpinile parentale, nu permit obţinerea unor randamente economice de conversie a celulozelor la oligoglucide.

12.4.2.1. Optimizarea producerii de celulaze

Compoziţia mediului de cultură

Primul mediu de cultură bazal pentru asigurarea cerinţelor nutriţionale şi fiziologice ale *Trichodermei viride* a fost elaborat de Mandels şi colaboratorii în 1962, suferind ulterior uşoare modificări. Acest mediu conţine $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4, $CaCl_2$, $MgSO_4$, uree, peptonă, sursă de carbon, oligoelemente şi microelemente ($FeSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $CoCl_2$).

În 1969, Reese şi Maguire au suplimemtat acest mediu cu 0,1-0,2% Tween 80, în scopul creşterii permeabilităţii membranelor şi al facilitării contactului dintre fibre şi miceliu .

Azotul este un element esenţial pentru sinteza de celulaze. Este importantă nu numai cantitatea în care acesta se găseşte în mediul de cultură, ci şi raportul dintre azotul organic şi cel anorganic. Ulterior, s-a demonstrat că adiţia de peptonă stimulează sinteza de β-glucozidază, enzimă deficitară în sistemul celulazic al

Trichodermei viride; o creştere a conținutului de peptonă de la 0,05 până la 2% dublează activitatea β-glucozidazei [Doppelbauer F. şi colab., 1987].

Inductori ai sintezei celulazice

Inductori clasici pentru sistemele enzimatice sintetizate de *Trichoderma reesei* şi *Trichoderma viride* sunt celuloza, celobioza, lactoza şi soforoza. Soforoza, un α-1,2-diglucid, este considerat inductorul natural al celulazelor. Cercetările au demonstrat că celobioza este un inductor cu eficiență redusă. Dintre glucidele menționate, lactoza este cea care se foloseşte pentru obținerea de preparate comerciale.

Deşi soforoza este considerat un inductor puternic, în sensul că este activ în concentrații mici, totuşi s-a observat că nivelul de biosinteză al celulazelor este mai ridicat atunci când se foloseşte celuloză pură [Persson I. şi colab., 1991]. Cele mai utilizate surse de celuloză pură sunt bumbacul, Solka Floc şi Avicel, conducând la obținerea de rezultate comparabile în ceea ce priveşte nivelul de sinteză celulazică.

Găsirea unor noi potențiali inductori pentru stimularea biosintezei de celulaze reprezintă o preocupare permanentă a cercetătorilor din domeniu. Astfel, s-au testat şi acidul lactobionic, lactuloza sau un amestec alcătuit din cei doi compuşi.

Toate sursele de carbon menționate sunt destul de scumpe pentru obținerea de celulaze comerciale, de aceea materialele lignocelulozice au apărut ca o alternativă la acestea. S-a demonstrat experimental că o serie de materiale cu conținut celulozic cum ar fi paiele de grâu, paiele de orz, paiele de orez, deşeurile de hârtie, rumeguşul reprezintă surse de carbon promițătoare pentru producerea de celulaze [Persson I. şi colab., 1991]. Pe aceste substrate se dezvoltă microorganisme mezofile sau termofile producătoare de celulaze, rezultând în final un lichid de biosinteză cu activitate enzimatică şi o fracțiune solidă cuprinzând resturile nemetabolizate împreună cu o biomasă bogată în proteine. În acest sens, Griffin demonstrează că deşeurile agricole ca atare, la concentrația de 2,5%, constituie un mediu de cultură convenabil şi complet pentru producerea enzimelor celulozolitice cu *Trichoderma viride*. Concentrații mai mari de substrat au efect inhibitor asupra fungului.

Factorul limitativ în utilizarea materialelor lignocelulozice ca inductori îl constituie necesitatea practicării unui pretratament înaintea utilizării lor în procesele fermentative.

În general, atunci când se folosesc materiale lignocelulozice drept surse de carbon, biosinteza celulazelor este mai redusă decât în cazul folosirii celulozei pure.

Cultivarea fungilor producători de celulaze, în prezența unei surse de carbon abundente, poate conduce la acumularea de glucoză şi la represia biosintezei celulazice. De aceea, maximum de sinteză celulazică se obține prin cultivarea fungilor pe medii conținând surse de carbon în concentrații limitate [Esterbauer H., şi colab., 1991].

Parametrii de fermentare

Pentru un proces de biosinteză, temperatura poate fi considerată unul dintre parametrii fizici cei mai importanţi, care este implicat profund, prin efectele sale, în optimizarea procesului.

Variaţiile temperaturii au efect asupra randamentului de transformare a substratului în produsul dorit, asupra cerinţelor nutritive ale microorganismelor şi compoziţiei biomasei obţinute precum şi asupra vitezei de creştere microbiană.

Temperatura optimă de cultivare a *Trichodermei reesei* şi a *Trichodermei viride* este de 30-31°C, în timp ce temperatura optimă pentru sinteza de celulaze este de 25-28°C.

Un factor important în cultivarea microorganismelor pentru sinteza de enzime este pH-ul. S-a dovedit că în mediile netamponate, pH-ul coboară la 2,7 iar activitatea β-glucozidazică scade pe măsură ce pH-ul devine mai acid. Este de remarcat că, la valori scăzute de pH, acumularea de glucide extracelulare este redusă, minimizând astfel represia catabolică [Sternberg D. şi Dorval S., 1979].

Când pH-ul se menţine la valori ce nu scad sub 5,0, β-glucozidaza se acumulează în mediu. Cea mai mare parte din activitatea β-glucozidazică se pierde între valori ale pH-ului de 3,0 şi 3,4, în timp ce fracţiunile exoglucanazice şi endoglucanazice sunt stabile.

În primele zile de cultivare, pH-ul scade la valori sub 3,0 nu datorită producţiei de acizi organici, ci a preluării rapide a ionilor de amoniu şi a acumulării concomitente de ioni de hidrogen în mediu. Conţinutul în fosfaţi ai mediului nu este suficient pentru a tampona pH-ul şi a-l menţine în jur de 5,0, iar adăugarea unor cantităţi mai mari de săruri cu fosfor dezechilibrează raportul componentelor mediului şi afectează dezvoltarea culturii.

Scăderea experimentală a pH-ului la 2,4 duce la inactivări de 20-50% ale exoglucanazelor şi endoglucanazelor. Reajustarea ulterioară a pH-ului atrage după sine şi recuperarea în timp a activităţii enzimatice. Utilizarea mediilor de cultură tamponate, cu tampon citrat pentru a se menţine pH-ul la valori de 5,0, duce la creşterea activităţii β-glucozidazice de 10 ori, deşi producţiile de exoglucanaze şi endoglucanaze sunt mult mai bune în mediul netamponat.

În culturile aerobe, este esenţial să se realizeze dizolvarea în mediu a întregii cantităţi de oxigen necesare microorganismului în orice moment al fermentaţiei, prevăzându-se în general un oarecare exces faţă de nevoi. De aceea, se urmăreşte în general obţinerea unor aeraţii cât mai eficiente, transferul de oxigen din faza lichidă (mediul de fermentaţie) având loc cu viteze mari.

Trichoderma viride este un microorganism aerob, şi ca urmare, în timpul fermentării este necesar un regim de aeraţie care să permită menţinerea unui nivel de oxigen dizolvat de 60-80% saturaţie.

12.4.2.2. Limitarea represiei catabolice

Celulazele sunt represibile, adică, dacă rata de disponibilizare a carbohidraţilor o excede pe cea necesară pentru metabolismul celular, sinteza celulazelor scade sau încetează. Represia are loc la nivelul sintezei de proteină

celulară ARN. Aceeaşi situaţie apare şi în cazul utilizării ca substrat şi inductor a unei celuloze amorfe sau cu un conţinut bogat de hemiceluloză. Efectul represiei prin catabolit (glucoza, celobioza) explică de ce nu pot fi menţinute nivele enzimatice constant înalte, sau să se mărească conţinutul în enzime prin adaosul de cantităţi mici de glucoză, celobioză, sau material celulozic proaspăt. Dacă la începutul bioprocesului, în mediul de cultură nu se detectează glucide, cantitatea de celulaze în momentul adaosului este suficient de mare pentru a hidroliza imediat celuloza amorfă din materialul celulozic proaspăt adăugat.

Represia catabolică accentuată, ce apare la tulpinile de *Trichoderma viride,* se explică prin faptul că acestea sintetizează β-glucozidază în cantităţi mai reduse, ceea ce permite acumularea în mediul de fermentare a celobiozei, diglucid ce nu este degradat cu viteză suficient de mare de enzima deficitară. Astfel, celobioza devine inhibitor al exoglucanazelor şi al endoglucanazelor.

Sistemul enzimatic celulazic prezintă un potenţial optim de biosinteză, atunci când rapotul dintre activitatea β-glucozidazică şi cea FPA-zică (Filter Paper Activity) este cuprins între 1,0 şi 1,5. Problema tulpinilor de *Trichoderma viride* este că acest raport are aproximativ valoarea 0,7, nefiind optim din punct de vedere al potenţialului hidrolitic.

Cercetările au demonstrat că, în general, la concentraţii ale glucidelor totale de 3-5%, viteza reacţiei enzimatice începe să scadă, în timp ce la concentraţii de 8-10% aceasta este aproape nulă [Reese E.T., 1950]. Cu cât concentraţia glucidelor totale din mediu este mai mare, cu atât mai repede se atinge concentraţia limită de glucide reducătoare ce se formează prin hidroliză enzimatică.

Pentru tulpinile de *Trichoderma viride* glucoza este un inhibitor mai slab decât celobioza, care anulează acţiunea catalitică a sistemului celulazic la concentraţii mai mari de 158 μM [. Fan L.T., 1987].

Limitarea inhibiţiei determinate de produşii de degradare acumulaţi în mediu se poate obţine prin menţinerea concentraţiei lor la valori reduse. Aceasta se realizează fie prin înlăturarea periodică sau continuă (dializă) a glucidelor reducătoare formate, fie prin degradarea lor chimică sau enzimatică.

O contribuţie importantă la rezolvarea problemei represiei catabolice au adus-o tehnicile de mutageneză şi inginerie genetică. Aplicarea acestora a condus la obţinerea de tulpini capabile să producă un sistem celulazic complet, folosind ca sursă de carbon glucoza sau lactoza şi care sunt mai puţin susceptibile represiei catabolice [Duff S. J. B. şi Murray W.D., 1996; Barnett C.C. şi colab., 1991].

12.4.3. Culturi mixte

Succesul bioconversiei unor materiale lignocelulozice depinde de capacitatea microorganismului de a sintetiza toate enzimele complexului celulazic, dar şi de activitatea acestor enzime. După cum s-a afirmat anterior, componentele sistemului celulazic sunt numeroase, şi, în general, microorganismele nu sunt capabile să le sintetizeze pe toate într-un raport optim hidrolizei enzimatice. Pe de altă parte, trebuie menţionat că, în natură, utilizarea celulozei se face nu prin culturi

pure de microorganisme, ci prin coexistenţa mai multor specii celulolitice şi necelulolitice.

Cocultura tulpinilor de *Trichoderma reesei* şi *Trichoderma viride* cu un alt microorganism are ca scop completarea sistemului celulazic cu β-glucozidază şi înlăturarea represiei catabolice. Pentru biosinteza de β-glucozidază, cele mai potrivite sunt tulpinile de *Aspergillus niger, Aspergillus phoenicis, Aspergillus wentii,* enzima produsă de aceste microorganisme fiind mai puţin sensibilă la inhibiţia prin produs finit decât cea biosintetizată de *Trichoderma sp.* În aceste fermentaţii mixte, se obţin preparate cu activităţi enzimatice mai mari decat ale celor obţinute în monocultură, în special atunci când tulpina de *Aspergillus* este introdusă în mediu la 15 ore de la începerea fermentaţiei cu tulpina de *Trichoderma.* Dezvoltarea tulpinii de *Trichoderma* este restricţionată însă de aciditatea puternică a mediului produsă de tulpina de *Aspergillus.*

Sinergismul dintre componentele celulazice sintetizate de *Trichoderma reesei* şi *Penicillium occitanis* a condus la activităţi enzimatice specifice superioare celor înregistrate atunci când aceste microorganisme au fost cultivate separat [Chaabouni S.E., 1994].

Coculturi eficiente se obţin cu *Clostridium thermocellum* şi *Zymomonas mobilis,* reuşind ca, după o perioadă de 6 zile, să se realizeze randamente convenabile în medii cu 2,5% celuloză [Hayn M., 1993].

Cultura mixtă reprezintă şi o modalitate eficientă de a menţine între anumite limite glucidele reducătoare, ce rezultă în timpul biodegradării celulozei şi care au acţiune inhibitoare. În acest scop, se practică coculturi ale fungilor de *Trichoderma sp.* cu tulpini selecţionate din genurile *Saccharomyces* şi *Candida.* În acest caz, drojdiile au rolul de a metaboliza glucidele fermentescibile rezultate în urma hidrolizei celulozei, îndepărtând factorul represiv al zaharificării şi conducând totodată la obţinerea de produse cu valoare economică ridicată.

12.4.4. Valorificarea unor materiale lignocelulozice prin bioconversie

În fiecare an sunt sintetizate circa 10^{12} tone de materiale cu conţinut celulozic, sau, conform altor statistici, 5 până la 15 tone pentru fiecare persoană. Datele statistice arată că, în prezent, doar 1 - 2% din biomasa disponibilă este utilizată ca alimente, pentru industria de celuloză şi hârtie sau ca sursă pentru diverşi compuşi organici. Drept consecinţă, o mare parte a biomasei vegetale se acumulează sub formă de deşeuri agricole şi silvice, ceea ce conduce la deteriorarea mediului înconjurător şi în acelaşi timp la pierderea unor potenţiale resurse materiale. În acest context, degradarea unor deşeuri şi subproduse agro-alimentare şi valorificarea lor sub formă de substanţe organice valoroase sau de energie este unul din domeniile ce a polarizat atenţia cercetătorilor în ultimele decenii.

Astfel, o amploare greu de imaginat a luat-o producerea industrială a preparatelor celulazice. Utilizarea sistemelor celulazice este destinată mai multor domenii dintre care:

- ❖ Hidroliza enzimatică a celulozei, în scopul obținerii glucozei și în general a monozaharidelor;
- ❖ Hidroliza enzimatică a celulozelor, în scopuri fermentative pentru obținerea alcoolilor inferiori și în mod special a celui etilic;
- ❖ Obținerea de metan prin transformare microbiană anaerobă;
- ❖ Obținerea de proteine cu valoare biologică ridicată (SCP);
- ❖ Obținerea prin biosinteză a unor compuși organici valoroși (acid lactic);
- ❖ Hidroliza enzimatică a celulozelor, în scopuri alimentare (panificație, sucuri, vin);
- ❖ Obținerea de reactivi enzimatici pentru definirea structurii poliglucidelor naturale;
- ❖ Hidroliza enzimatică a celulozelor, în scopul obținerii de furaje superioare calitativ din punct de vedere al digestibilității componentelor grosiere ale hranei;
- ❖ Hidroliza enzimatică a fibrelor celulozice, pentru înmuierea fibrelor de bumbac și creșterea calității textilelor;
- ❖ Obținerea de medicamente destinate corectării unor deficiențe ale tractului gastro-intestinal;
- ❖ Hidroliza enzimatică a structurilor parietale, în vederea obținerii protoplaștilor.

Biodegradarea materialelor lignocelulozice a fost tratată ca o simplă hidroliză enzimatică până la mijlocul anilor `80, când Wright și colaboratorii au prezentat potențialul procesului de zaharificare și fermentare simultană SSF [Klyosov A.A., 1990]. Cel mai important avantaj al acestui proces, comparativ cu hidroliza și fermentarea practicate separat, este eliminarea efectului represiv al glucozei asupra sintezei celulazice.

În ultimul deceniu a apărut o abordare nouă a biodegradării și anume prin "bioproces consolidat" (CBP), ce este sinonim cu conversia microbiană directă ce se realizează într-o singură etapă [Lynd L.R., 2002]. Aplicarea acestui concept este încă condiționată de obținerea de microorganisme care să poată utiliza în condiții optime substratul, și, în același timp, să conducă la obținerea de cantități mari de produși finali urmăriți a se realiza.

Valorificarea deșeurilor și a subproduselor de natură lignocelulozică prin zaharificarea și fermentarea simultană nu este un proces simplu, ci trebuie privit ca un proces secvențial, în care este necsar să fie parcurse mai multe etape:

1. Colectarea deșeurilor și a subproduselor de la unități de industrializare sau direct din teren;
2. Pretratarea materialului lignocelulozic prin metode mecanice, chimice, fizice, biologice sau mixte, în vederea modificării sau îndepărtării compușilor nedoriți (lignină, hemiceluloze);

3. Hidroliza enzimatică prin cultivarea unor microorganisme capabile să scindeze celuloza sau prin utilizarea de preparate enzimatice;
4. Fermentarea glucidelor la alcool sau pentru obţinerea de proteine cu valoare alimentară (SCP);
5. Tratarea reziduului pentru reducerea poluării sau recuperarea biomasei lignocelulozice parţial degradată pentru includere de furaje.

În majoritatea cazurilor, zaharificarea şi fermentarea simultană se aplică pentru obţinerea de etanol din deşeuri agricole (coceni de porumb, paie de grâu, rumeguş, deşeuri provenite de la industrializarea sfeclei de zahăr). Acest proces se poate însă direcţiona şi în alte scopuri, prin selecţionarea microorganismelor şi prin modificarea mediilor de cultură şi a parametrilor de cultivare.

Valorificarea digestivă redusă a substanţelor nutritive din furajele grosiere constituie o preocupare pentru nutriţionişti de a găsi metode şi tehnici de preparare, prin care aceste nutreţuri să devină un component obişnuit al raţiilor furajere destinate rumegătoarelor. Administrate în stare brută, nutreţurile grosiere sunt utilizate în organismul animal în proporţie de numai 20-30% din potenţialul real productiv.

Scopul utilizării enzimelor celulozolitice constă în îmbunătăţirea comestibilităţii şi a digestibilităţii componentelor nutritive, prin care se ridică efectiv valoarea productivă a unor categorii de nutreţuri.

Pe de altă parte, administrarea unor materiale lignocelulozice parţial degradate facilitează acţiunea propriilor microorganisme ruminale.

Până în prezent, prepararea nutreţurilor voluminoase celulozice s-a efectuat, în principal, prin metode mecanice şi chimice, în viitor aşteptându-se extinderea celor de tip biotehnologic.

Prepararea nutreţurilor celulozice prin metode biotehnologice, care au înlocuit şi vor continua să înlocuiască parţial produsele principale naturale sau cultivate (fânuri, suculente), trebuie să asigure valorificarea întregului lor potenţial nutritiv.

În prezent, enzimele disponibile din categoria celulazelor sunt utilizate în hrana porcinelor şi a păsărilor, în condiţiile utilizării în structura nutreţurilor combinate a orzului şi a ovăzului care, prin pleava bobului, ridică nivelul celulozic.

Modul de tratare a grosierelor pentru rumegătoare nu a depăşit faza de microproducţie, dar rezultatele obţinute permit aprecierea că, în viitor, prepararea enzimatică a acestei categorii furajere poate readuce interesul nutriţional pentru unele sortimente.

Descoperirile microbiologiei ruminale, identificarea factorilor de stimulare celulozolitică, posibilităţile de obţinere a celulazei ruminale sau a celulazelor de origine bacteriană sau fungică precum şi alte sisteme enzimatice, vor permite revoluţionarea metodelor de preparare a nutreţurilor voluminoase celulozice.

13. BIOTEHNOLOGII AGROALIMENTARE

13.1. BIOTEHNOLOGII CLASICE FERMENTATIVE

Din cele mai vechi timpuri fermentaţia a reprezentat un important mijloc de conservare a alimentelor, dar şi o modalitate de obţinere a unor gusturi şi parfumuri alimentare agreabile, atât de importante satisfacerii exigenţelor culinare în continuă evoluţie pe mapamond. După cum se ştie, creşterea populaţiei microbiene naturale sau inoculate pe un anumit substrat duce la modificări chimice şi/sau texturale ale acestuia, ceea ce determină un produs care poate fi stocat timp îndelungat, dar care prezintă totodată şi caracteristici gustative extrem de variate în funcţie de specia şi respectiv tulpina microbiană.

În cele ce urmează vom aborda câteva produse ale biotehnologiilor fermentative clasice care deşi cunoscute din cele mai vechi timpuri, prezintă astăzi o mare diversitate, fiind rodul unor procese tehnologice perfect dirijate, graţie progreselor microbiologiei, ingineriei genetice şi a tehnicilor de automatizare din ce în ce mai performante.

13.1.1. Produsele lactate

Laptele fermentat poate avea gusturi şi arome dintre cele mai variate, în funcţie de inoculul microbian utilizat şi de condiţiile de incubare, aşa cum reiese din **tabelul 13.1**.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.1

Principalele produse lactate fermentate şi microorganismele implicate (după Prescott, Harley si Klein, 1993)

Nr.crt.	Produsul fermentat	Microorganismul implicat	Descriere
1	Laptele acru	*Lactobacillus acidophilus*	Lapte degresat, sterilizat şi inoculat cu tulpina microbiană
2	Untul fermentat	*Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* *Leuconostoc cremoris* *Lactococcus cremoris*	Produs obţinut pornind de la lapte pasteurizat degresat sau semidegresat
3	Kefirul	*Lactococcus lactis* *Lactobacillus bulgaricus* *Saccharomyces sp.*	Produs al unei fermentaţii lactice si alcoolice mixte
4	Smântâna fermentată	*Lactococcus sp.* *Leuconostoc sp.*	Smântâna inoculata şi incubata până la dezvoltarea unei aciditâţi corespunzătoare tipului de produs
5	Iaurtul	*Streptococcus thermophilus* *Lactobacillus bulgaricus*	Lapte degresat sau semidegresat inoculat cu bacteriile specifice şi la care se adaugă un stabilizator care îi dă consistenţă gelatinoasă
6	Untul	*Lactococcus lactis*	Smântâna inoculata şi incubată până la gradul de acidifiere dorit, urmată de operatiunea de batere pentru extragerea untului şi apoi spălarea şi sărarea

Aceste bacterii sunt denumite cu titlul generic de ***bacterii lactice.*** Ele apar în determinatorul de bacterii „Bergey's Manual", la secţiunea a 14-a, în cadrul celor 7 genuri de bacili gram + regulaţi, nesporulanţi şi în general imobili. Ei sunt mesofili şi chimioheterotrofi şi se dezvoltă numai în medii complexe. Genul cel mai mare este *Lactobacillus*. Acesta conţine bacili şi uneori cocobacili lipsiţi de catalaze şi citocromi, în general facultativi aerobi sau microaerofili şi care produc acid lactic ca produs unic sau major al fermentaţiei lactice. Lactobacilii realizează

fermentația homolactică pe calea Embden-Meyerhof sau fermentația heterolactică pe calea pentoz-fosfatazelor. Se dezvoltă cel mai bine în condiții de ușoară aciditate când pH-ul este apropiat de 4,5-6,4. Acest gen de bacterii se găsește pe suprafața plantelor, în produsele lactate, carne, apă, ape de canal, bere, fructe și în multe alte produse. Unele specii fac parte din flora normală a corpului uman, găsindu-se în gura, în tractusul intestinal și vaginal. În general nu sunt patogene.

Lactobacilii sunt indispensabili în nenumărate industrii alimentare, așa cum vom vedea în cele ce urmează. Trebuie reținut însă faptul că există și specii responsabile de alterări ale unor produse alimentare (bere, lapte, carne).

În ceea ce privește tehnologia de obținere a produselor lactate în care sunt implicate aceste bacterii, ea este în general similară. Acidul produs de către microorganisme în timpul fermentației provoacă o denaturare a proteinelor. Laptele se inoculează cu tulpina microbiană dorită, apoi se realizează incubarea la temperatura optima si se oprește evoluția microflorei prin procedee tehnologice adecvate de răcire. Se utilizează culturi de *Lactobacillus sp.* și de *Lactococcus lactis* pentru a determina obținerea gustului caracteristic și a acidității corespunzătoare. *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* convertește citratul din lapte în diacetil care dă un gust specific de nuci produsului finit. Aceste microorganisme sunt utilizate și pentru obținerea smântânei fermentate si a untului.

Iaurtul se pare că este cel mai popular dintre produsele lactate fermentate, așa cum arată statisticile în domeniu. Produsul comercial se obține din lapte degresat și pasteurizat, răcit la 43°C sau mai puțin și inoculat cu *Streptococcus thermophilus* și *Lactobacillus bulgaricus* în proporții egale. În timpul creșterii în paralel a celor doua microorganisme, ele acționează împreună transformând aproape toată lactoza în acid lactic și parfumând iaurtul ca urmare a formării diacetilului (*Streptococcus thermophilus*) sau a acetaldehidei (*Lactobacillus bulgaricus*). Adausul de fructe pasteurizate, se practică pentru obținerea de iaurturi speciale. Iaurtul proaspăt preparat conține 10^9 bacterii pe gram produs.

Lactatele fermentate au un efect benefic asupra organismului uman. De exemplu, *Lactobacillus acidophilus* modifică flora microbiană a intestinului inferior, ameliorând starea de sănătate generală și servind totodată ca produs dietetic în unele regimuri alimentare. Numeroase microorganisme specifice produselor lactate fermentate stabilizează microflora intestinului și unele au chiar proprietăți antimicrobiene. Este deja cunoscut faptul că dieta cu produse lactate fermentate are un rol important în reducerea colesterolului seric. De asemenea, mulți lactobacili au în membrana lor compuși anticancerigeni. Observațiile efectuate în sfera medicală au arătat că regimurile alimentare cu produse în care sunt implicate bacteriile lactice și în mod particular *Lactobacillus acidophillus*, contribuie la controlul cancerului de colon.

Un alt grup de bacterii implicate în bipotehnologiile fermentative clasice este acela al ***bifidobacteriilor***. Astfel, genul *Bifidobacterium* conține celule în formă de bastonaș de dimensiuni variabile, nesporogene, Gram+, iar extremitatea celulelor are caracteristica de a avea formă de crosă (figura 13.1).

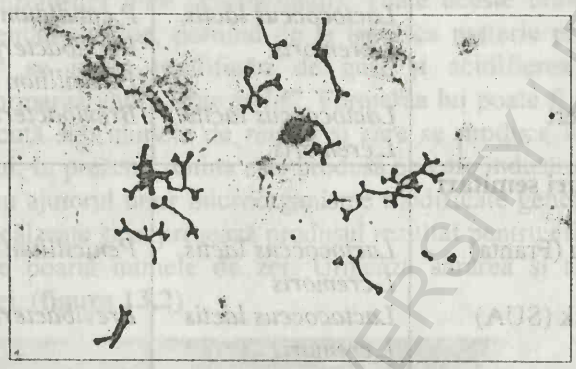


Figura 13.1. *Bifidobacterium*, un bacil util sănătății noastre – imagine microscopică

Acest gen de bacterii nu sunt mobile, sunt anaerobe și fermentează lactoza ca și alte zaharuri de altfel, în acid acetic și lactic. Fac parte în mod normal din flora intestinală umană, lucru descoperit în 1906. Mai multe proprietăți benefice le-au fost atribuite acestor bacterii, ceea ce le dă o valoare practică deosebită în biotehnologiile fermentative. Aceste bacterii ameliorează toleranta la lactoza, posedă o activitate antitumorală și reduce nivelul colesterolului seric, la fel ca și grupul prezentat anterior. În plus, ele favorizează absorbția calciului și sinteza vitaminei B. În prezent se produc și comercializează numeroase produse lactate fermentate ameliorate cu bacterii din genul Bifidus.

Branza este unul dintre cele mai vechi produse alimentare, preparate de om de mai bine de 8 000 ani. De-a lungul evoluției umane s-au creat peste 2 000 de varietăți de brânză diferite, care fac parte din 20 tipuri generale (**tabelul 13.2**).

Tabelul 13.2.

Principalele grupe de brânzeturi și microorganismele implicate în producerea lor (după Prescott, Harley si Klein, 1993)

Nr. crt	Tipul de brânză și țara de origine	Microorganismele implicate în primele stadii tehnologice	Microorganismele implicate în stadiile tehnologice finale
1	**Brânzeturi moi neafinate, italiene:**	*Lactococcus lactis*	
	- brânză albă	*L.cremoris*	*L.cremoris*
	- brânză cremoasă	*L.diacetylactis*	
		S.thermophilus	
		Lactobacillus	

	- Mozzarella	*bulgaricus* *S.thermophilus*	
2.	**Brânzeturi moi afinate franțuzești:**		*Penicillium camemberti*
	Brie	*Lactococcus lactis* *L.cremoris*	*P.candidum* *Brevibacterium linens* *Penicillium camemberti*
	Camembert	*Lactococcus lactis* *L.cremoris*	*Brevibacterium linens*
3.	**Brânzeturi semitari afinate :**		
	- Bleu (Franta)	*Lactococcus lactis* *L.cremoris*	*Penicillium roqueforti*
	- Brick (SUA)	*Lactococcus lactis* *L.cremoris*	*Brevibacterium linens*
	- Herve limburger (Belgia)	*Lactococcus lactis* *L.cremoris*	*Brevibacterium linens*
	- Monterey (SUA)	*Lactococcus lactis* *L.cremoris*	
	- Munster (Franta)	*Lactococcus lactis* *L.cremoris*	*Brevibacterium linens*
	- Roquefort (Franta)	*Lactococcus lactis* *L.cremoris*	*Penicillium roqueforti*
4.	**Brânzeturi dure afinate**	*Lactococcus lactis*	*Lactobacillus casei*
	- Cheddar (Marea Britanie)	*L.cremoris* *E.durans*	*L.plantarum*
	- Colby (SUA)	*Lactococcus lactis* *L.cremoris* *E.durans*	*Lactobacillus casei*
	- Edam (Olanda)	*Lactococcus lactis* *L.cremoris*	
	- Gouda (Olanda)	*Lactococcus lactis* *L.cremoris* *L.diacetylactis*	
	- Gruyere (Elvetia)	*Lactococcus lactis* *L.cremoris* *S.thermophylus*	*Propionibacterium shermanii* *P.freudenreichii*
5.	**Brânzeturi foarte dure afinate**		
	- Parmezanul (Italia)		*Lactobacillus bulgaricus*

BCUVS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Brânzeturile sunt grupate în mai multe categorii după textura şi implicit după consistenţa lor. Astfel se distinge grupa brânzeturilor care se prezintă sub forma de pastă moale aşa-numitele brânzeturi moi (brânza albă, brânza topită, brânza de Brie), grupa brânzeturilor care se prezintă sub formă de pastă semimoale (munster, herve, bleu), grupa brânzeturilor presate sau tari (cedar, colby, gruyere) sau aceea a brânzeturilor dure (Parmezanul). Toate aceste brânzeturi rezultă în urma unei fermentaţii lactice, pornind de la lapte ca materie primă. Utilizând o „cultură starter" se induc modificări de gust şi acidifierea substratului de fermentaţie cu formarea unui „lapte prins". Formarea lui poate fi determinată şi de o enzimă cunoscută sub numele de *renina* şi care se produce în mod natural în stomacul vițelului. În prezent, renina este produsă pe cale industrială prin procedee biotehnologice cu ajutorul unor microorganisme modificate genetic. După faza de lapte prins, se încălzeşte şi se presează produsul rezultat pentru eliminarea parţială a lichidului care poartă numele de zer. Urmează sărarea şi apoi afinarea sau maturarea brânzei. (**figura 13.2**)

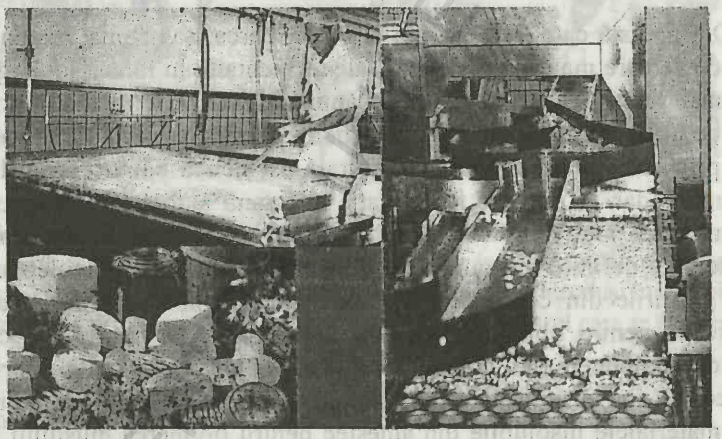


Figura 13. 2. Imagini din fluxul tehnologic de obţinere a brânzeturilor la Fromageria Col Bayard (Franţa): incorporarea fermenţilor selecţionaţi, omogenizarea materiei prime şi încălzirea acesteia în vederea separării zerului; repartizarea produsului semifinit în forme rotunde şi presarea pentru extragerea zerului; afinarea sau maturarea.

Pentru trecerea la maturarea brânzei, produsul presat se poate supune unei condiţionări cu sau fără microorganisme suplimentare. De exemplu, în cazul brânzeturilor aşa-numite „bleu", cum este cazul brânzei Roquefort, se însămânţează produsul în faza de lapte prins cu spori de *Penicillium roqueforti* chiar înainte de tratamentul final. Uneori se practică şi inocularea doar la suprafaţă a brânzei care este deja formată, chiar la debutul afinajului. Este cazul, spre exemplu, a brânzei Camembert. Inocularea în acest caz se face cu spori de *Penicillium camemberti.* Fermentaţia finală a brânzei este în parte funcţie de durata afinajului. Brânzeturile moi nu se afinează decât 1-5 luni, pe când brânzeturile tari necesită un afinaj mai prelungit, de 3-12 luni, iar cele extratari se afinează chiar 12-16 luni.

Pentru multe brânzeturi cum ar fi cele elveţiene - gruyere (cunoscutul caşcaval cu găuri), afinajul reprezintă un moment decisiv al fluxului tehnologic. În timpul procesului de afinaj se produce un gaz ca urmare a activităţii unei tulpini bacteriene din genul *Propionibacterium.* Odată cu acest gaz se formează atât gustul final bine cunoscut, cât şi găurile caracteristice acestui produs.

Unele brânzeturi, cum ar fi herve, sunt scufundate într-o saramură pentru stimularea dezvoltării unor micete şi a unor bacterii specifice, responsabile de gustul caracteristic.

13.1.2. Produsele fermentate de origine vegetală

Produsele fermentate de origine vegetală sunt mult mai numeroase, iar variantele tehnologice mult mai diverse.

13.1.2.1. Băuturile alcoolice fermentate

Din această categorie fac parte: vinul, berea, şampania, distilatele care au ca punct de plecare materii prime vegetale fermentate. În lumea întreagă se produc din cele mai vechi timpuri o serie de băuturi alcoolice fermentate, pornind de la musturi de origine vegetală ce conţin glucide fermentescibile. Din aceste musturi se obţin prin fermentaţie spontană, naturală asemenea băuturi încă din cele mai vechi timpuri, dar în prezent fermentaţia spontană a fost total înlocuită, aceasta realizându-se tot mai mult cu tulpini de levuri special destinate obţinerii unor sortimente bine definite din punct de vedere tehnologic şi organoleptic, menite să satisfacă gusturile din ce în ce mai exigente ale consumatorilor. Dacă ar fi să exemplificăm, pentru obţinerea mustului de braserie pornind de la cereale, este necesară descompunerea glucidelor complexe din substratul materie primă. Acesta se amestecă cu apa şi se încălzeşte în timpul etapei de brasaj. Se înlătură în cele ce urmează materialele insolubile din amestec pentru obţinerea mustului de braserie, un lichid limpede bogat în glucide fermentescibile. Arta producerii berii constă în cea mai mare parte în modul de hidrolizare controlată a proteinelor şi a glucidelor pentru a da gust şi corpolentă produsului final. Rolul microorganismelor este incontestabil.

Vinul şi şampania

Problemele referitoare la tehnologiile de obţinere şi conservare ale vinurilor sunt reunite sub numele de oenologie (de la cuvintele greceşti *oenos* = vin si *logos* = ştiinţă). Deşi fabricarea vinului este un proces preponderent biotehnologic, fiind determinat de corelaţia viţă de vie – levuri, numeroase inovaţii introduse deja în producţie au un caracter mai mult tehnologic decât microbiologic. Este vorba despre tehnicile moderne de decantare, filtrare, flotare, îmbuteliere, control automat al temperaturii de fermentare etc. Oenologia este însă o veritabilă producţie biotehnologică. Ea are ca punct de plecare mustul care nu este altceva decât un extract celular conţinând apă şi substanţe glucidice pe de o parte şi enzime, biocatalizatori pe de altă parte (după Sarghi si Zironi, 1994).

Procesul tehnologic de obţinere a vinului porneşte cu recoltarea strugurilor, extragerea mustului prin tehnici caracteristice, fermentarea acestuia şi maturarea produsului obţinut în mod diferenţiat în funcţie de tipul de vin pe care dorim să-l producem. Mustul de struguri este la majoritatea soiurilor alb (excepţie fac soiurile tinctoriale cu pulpa fructului roşie). Pentru obţinerea vinului roşu se păstrează în contact mustul cu pieliţele strugurilor pentru extragerea compuşilor colorați. Încă în antichitate se cunoaşte tehnica obţinerii vinului prin fermentaţia spontană a mustului, adică prin activitatea microflorei naturale ce se găseşte la recoltare pe pieliţa boabelor de struguri (figura 13.3).

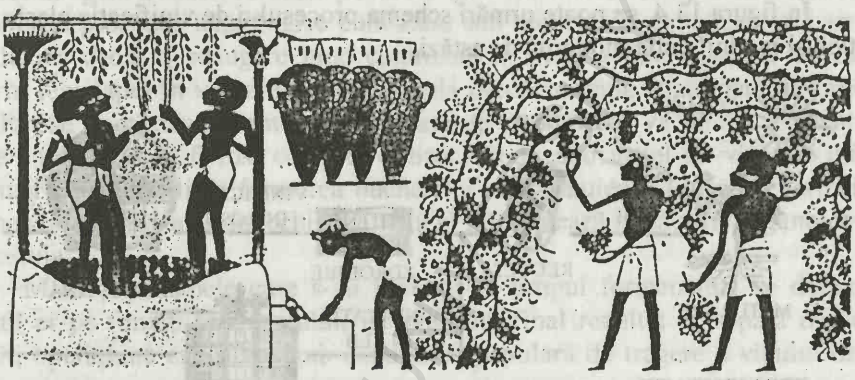


Figura 13.3. Primul tratat de oenologie ilustrat sub forma unor benzi desenate a fost pictat de Nakht, scribul responsabil cu gestionarea pivniţelor lui Thoutmosis al III lea; imaginile evidenţiază etapele obţinerii vinului: strugurii sunt culeşi şi introduşi în zdrobitoare unde mustul este extras prin călcarea în picioare a ciorchinilor; mustul care se scurge este adunat în amfore unde fermentează;

În **tabelul 13.3** putem observa care este structura microflorei microbiene naturale pe struguri şi în must.

Tabelul 13.3.

Structura diferitelor grupe de microorganisme ce intră în componenţa microflorei naturale caracteristice strugurilor şi mustului de struguri (după Deltei D, 1988)

	Struguri (celule/g)	Must (celule/ml)
Ciuperci	10-10 5	10-10 5
Levuri oxidative	10-10 5	10-10 5
Levuri apiculate	10-10 2	10 5 - 10 6
Levuri fermentative	<1	10 3- 10 5
Bacterii acetice	<1	10 3- 10 6
Bacterii lactice	<1	10 3- 10 5

În condiţiile în care în prezent se supun procesului de vinificaţie cantităţi mari de must, fermentaţia spontană, naturală are rezultate imprevizibile, cel mai

adesea negative. Pentru evitarea acestor probleme, se tratează mustul proaspăt cu anhidrida sulfuroasă şi se adaugă tulpini de levuri selectionate. Levurile selecționate cel mai frecvent folosite aparțin speciilor *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomycer chevalieri, Saccharomyces ellipsoideus*. După inocularea cu levurile selecționate, mustul fermentează timp de 3-5 zile la temperaturi cuprinse între 20 şi 28°C. În funcție de toleranța la alcool a suşei levuriene, produsul final poate avea o tărie alcoolică diferită, între 10 şi 18% vol. alcool. Limpezirea şi dezvoltarea buchetului caracteristic în funcție de soi şi suşa de drojdii utilizată se dezvoltă pe parcursul procesului de vinificație, dar şi în timpul învechirii.

În figura 13.4. se poate urmări schema procesului de vinificație clasic ce se practică şi în vinificația modernă de astăzi.

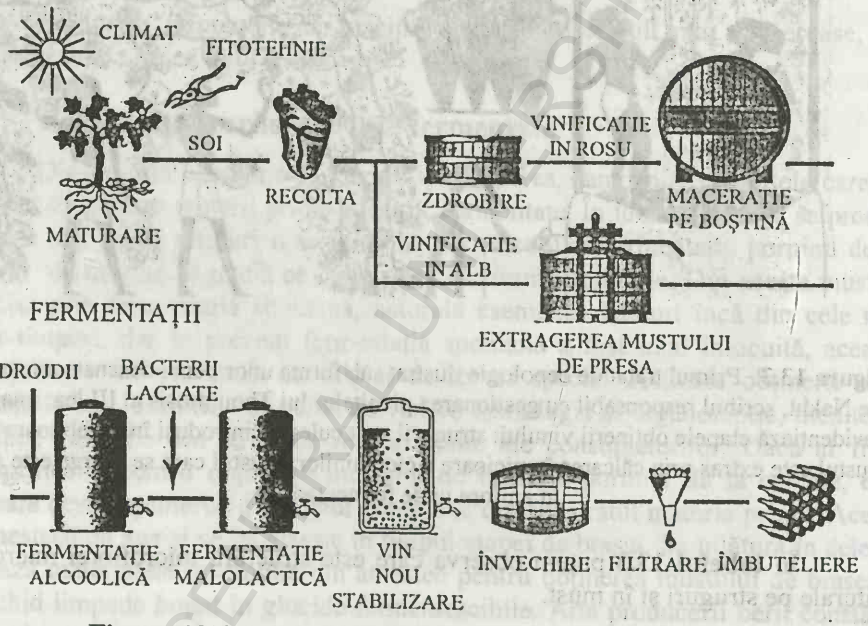


Figura 13.4. Schema clasică a procesului de vinificație.

După cum se vede, transformarea strugurilor în vin este o lungă succesiune de reacții biochimice, chimice şi fizico-chimice. Ca urmare a acestei complexe succesiuni care începe încă în struguri şi se termină abia după învechirea vinului finit, putem considera producerea vinului o veritabilă biotehnologie în a cărei desfăşurare oenologul intervine în prezent pentru obținerea unui produs de calitate superioară. Primele reacții biochimice au loc deja în struguri, în timpul maturării acestora. Soiul are o influență covârşitoare în obținerea unui anumit tip de produs, dar asupra lui intervin elemente de climat, sol, şi evident de fitotehnie aplicată. În continuare intervin alte reacții determinate de procesul de vinificație (zdrobirea şi desciorchinarea, extragerea mustului ravac sau de presă, declanşarea fermentației cu intervenția microorganismelor implicate: drojdii şi bacterii caracteristice). Reacțiile chimice şi fizico-chimice ce urmează sunt date de

migrarea unor constituenți din bobul de strugure în must în timpul macerației și transformarea lor în timpul fermentației. În timpul stabilizării și maturării vinului au loc o serie de procese de precipitare, oxidare, polimerizare, floculare care duc la obținerea la final a produsului finit. Oenologul controlează toate aceste reacții și intervine în mod specific, în funcție de tipul de produs pe care dorește să-l obțină.

O problemă delicată a oenologiei este aceea a producerii vinului sec (fără zahăr rezidual) sau mai dulce (demisec, demidulce) care conține o cantitate variabilă de zahăr nefermentat. Cantitatea de zahăr este un paramentru important al mustului în egala măsură. Aceasta poate fi reglată înainte de începerea fermentației prin diferite procedee tehnologice cunoscute sub numele de saptalizare și care nu este altceva decât o adăugare bine controlată în must a unei cantități de zahăr conform legislației în vigoare. Pornind de la o concentrație superioară în zahăr a mustului, se va obține o cantitate mai mare de alcool care va inhiba fermentația înainte ca zahărul să fi fost complet utilizat, producând astfel un vin mai dulce. Compușii responsabili de formarea buchetului se acumulează în timpul fermentației finale și pe parcursul învechirii vinului și influențează trăsăturile organoleptice ale acestuia.

Microorganismele care s-au înmulțit în timpul fermentației se depun la sfârșitul ei pe fundul recipientului, iar produsul final rezultat se separă de acest depozit, operațiune cunoscută sub denumirea populară de tragere a vinului de pe drojdii.

Șampania este tot un produs de fermentație care pornește deja de la o materie primă rezultată în urma fermentației – vinul. Așa numitul vin efervescent se pare că datează din perioada Evului Mediu (sec. XII -XIII), perioada în care obținerea acestui produs a fost pur întâmplătoare. Celebra metodă „champenoise" a fost însă pusă la punct ulterior de către călugărul Don Perignon din regiunea Champagne (anul 1700).

Fabricarea șampaniei presupune următoarele etape:

- prepararea vinului alb materie primă;
- tragerea în sticle și adăugarea unei licori glucidice denumită licoare de tiraj împreună cu un inoculum de levuri selecționate cu mare capacitate aglomerantă, cu rezistența la concentrații superioare de alcool, pentru ca materia primă are deja 10-11,5% vol. alcool;
- fermentarea la sticlă a zahărului adăugat, cu așezarea sticlelor în poziție culcată;
- se formează CO2 la o presiune de 5-6 bari; etapa durează 5-8 săptămâni, dar produsul rezultat rămâne până la un an în contact cu levurile autolizate, în măsura de a elibera o multitudine de compuși care concură la calitățile organoleptice ale vinului de Champagne (învechire pe strat de drojdie);
- sticlele se plasează cu dopul în jos și se rotesc periodic pentru a determina depunerea levurilor în interiorul dopului; operațiunea durează 1-2 luni și se numește remuaj;

- degorjajul, adică extragerea dopului și odată cu el a depozitului aglomerat în acesta este ultima etapă; lichidul rezultat este perfect clar, iar sticlele se închid definitiv cu dopul cu căpăstru specific acestui produs;

Această ultimă etapă este efectuată manual, ceea ce explică prețul atât de ridicat al produsului finit. În prezent se folosesc giropaleți pentru remuaj mecanizat dirijat prin microprocesoare. Tehnica a început să se utilizeze tot mai mult, făcând din ce în ce mai accesibilă ca preț băutura de tip champagne. De asemenea, se folosesc levuri puternic floculante sau bile de alginat pentru aglomerarea rapidă și eficientă a drojdiilor după fermentație și eliminarea mult mai puțin costisitoare; aceasta tehnică relativ recenta, brevetată în Franța, a eliminat complet remuajul.

Levurile selecționate în biotehnologia producerii vinurilor

Spre deosebire de alte biotehnologii fermentative, în oenologie materia primă nu este pasteurizată și conține o microfloră spontană de valoare tehnologică incertă. Levurajul, adică însămânțarea mustului cu o suș selecționată, pentru atingerea unor performanțe fermentative reale, reprezintă o practică în plină expansiune în vinificație.

Sușele oenologice trebuie să răspundă la un anumit număr de aptitudini de bază care constituie de fapt caracteristicile lor intrinsece pe care se bazează activitatea de selecție și trebuie de asemenea, să fie adaptate pentru fiecare regiune viticolă, pentru ca vinul obținut să conserve trăsăturile de autenticitate și de tipicitate.

Ameliorarea sușelor de levuri destinate industriei vinului, dar și a altor bioindustrii care folosesc levuri pentru realizarea proceselor fermentative de bază, este în prezent o activitate de interes major în întreaga lume.

Un consorțiu de laboratoare europene lucrează din 1993 în cadrul a trei programe de biotehnologie: CEE, BAP, BRIDGE & BIOTECH, utilizând *variabilitatea genetică naturală și tehnicile geniului genetic* pentru cunoașterea aprofundată a potențialului genetic al tuturor genurilor de levuri identificate până în prezent și pentru identificarea altora, în scopul îmbogățirii băncilor de gene și a punerii la punct a celor mai bune tehnici de manipulare a informației genetice, cu efecte practice superioare pentru industria alimentară, farmaceutică, sănătate, etc.

Există de asemenea, o serie de programe care vizează în principal levurile din industriile alimentare tradiționale: oenologie, bere, pâine.

Se află pe prim plan probleme referitoare la capacitatea lor de floculare, toleranța la etanol, producerea de arome, caracterul "killer", aptitudinile la liofilizare și la producerea de L.S.A.(Levures Seches Actives-Levuri Deshidratate Active).

Activitatea de selecție prin metode clasice se desfășoară continuu, folosirea markerilor moleculari venind în prezent în ajutorul selecționatorilor de microorganisme pentru diverse bioindustrii.

În 1991 a fost creeată *"Yeast Industry Platforme"* care reunește întreprinderi industriale ce utilizează levuri în domeniile chimiei, agroalimentar și farmaceutic.

Mult timp intervenţia microorganismelor în procesul vinificaţiei a fost subestimată, considerată de tehnologi ca un proces static, puţin modificabil şi fără influenţă asupra produsului finit, neglijându-se faptul că oenologia este un proces biotehnologic în care mustul de struguri este însuşi substratul nutritiv pe care îşi desfăşoară activitatea vitală levurile. Aprofundarea cunoştinţelor legate de fiziologia şi genetica drojdiilor a adus acest grup de microorganisme la locul potrivit în cadrul procesului de vinificaţie, reuşind să se dovedească faptul că diversificarea sortimentului de vinuri pe plan mondial, producţiile industriale tot mai mari, precum şi diversitatea condiţiilor climatice şi tehnologice, impun dezvoltarea tehnicilor de selecţionare a unor suşe de levuri tot mai adaptate.

Conform datelor sugerate de Delteil D. (1988), aşa cum am văzut în tabelul 3, raportul dintre levurile fermentative şi cele apiculate în mustul proaspăt, variază între 1:10 ş 1:100, în dependenţă şi de condiţiile igienice şi de mediu din perioada recoltare - vinificaţie primară. De asemenea, raportul levuri fermentative: bacterii, este în general tot în defavoarea levurilor fermentative (1:1 şi 1:10).

Astfel, este de la sine înţeles faptul că aspectul microbiologic al mustului este prea puţin încurajabil pentru calitatea viitorului vin, ţinând seama că levurile apiculate şi bacteriile odată dezvoltate în must, pot fi cauza unor deteriorări ireversibile ale produsului finit (Heard G. - 1985, Raukine B. - 1972, Ribereau Gayon J. - 1975).

Toate studiile de până acum arată faptul că levurile eliptice din specia *Saccharomyces cerevisiae*, precum şi numeroase suşe rezultate în urma activităţii de selecţie şi ameliorare ale acesteia au capacitatea de a da un produs finit de calitate superioară, sunt tolerante faţă de alcool şi dau o producţie inferioară de acizi volatili.

Mulţi oenologi păstrează încă vechile concepţii conform cărora fermentaţia spontană este singura în măsură de a păstra tipicitatea unui vin, în condiţiile în care, în opinia lor, a avut loc o selecţie naturală a levurilor din flora spontană. Această situaţie este valabilă doar în plan teoretic şi nu este de loc plauzibilă în condiţiile noilor sisteme agro-comerciale în care echilibrul microflorei epifite specifice zonei este perturbat prin utilizarea masivă a substanţelor antiparazitare care determină apariţia unor drojdii rezistente, dar indezirabile din punct de vedere oenologic, în detrimentul speciilor de bună calitate.

De asemenea, introducerea viticulturii în noi regiuni unde nu există o floră levuriană naturală favorabilă pentru vinificaţie, impune aplicarea levurajului cu suşe pure.

Spre exemplu, în California (Amerine şi Joslin, 1951) se lucrează numai cu levuri pure.

În Australia au existat multe probleme cu levurile indigene, oenologii fiind forţaţi să lucreze cu levuri pure (Raukine, 1963).

Tendinţa actuală pe glob este de a realiza o vinificaţie industrială în combinate de mari dimensiuni. Cea mai mare cramă din lume: Gallo din California, care produce anual peste 180 milioane litri vin trebuie să asigure obţinerea unui produs uniform din punct de vedere calitativ, lucru imposibil de realizat printr-o

fermentație spontană. Chiar și țările cu viticultură clasică și de mare tradiție nu mai lucrează în prezent decât cu levuri selecționate în culturi pure.

Astăzi se produc pe plan mondial aproximativ 300 milioane hl vin, dintre care 75% sunt realizați în Europa. Primele trei țări din lume în domeniul producției de vin sunt: Italia, Franța și Spania, cu producții de peste 150 mil. hl.

În ultimii 10 ani această industrie s-a extins în țări care inițial nu erau de mare tradiție. Astfel asistăm la o creștere a producției de vin cu 10 - 23 % în țări cum ar fi: Canada, S.U.A., Germania, Suedia, Australia, Japonia.

În contextul în care vinificația mondială a luat un avânt deosebit, evoluția tehnologiei vinicole s-a realizat în paralel cu evoluția laturii microbiologice a acesteia, oenologia devenind o veritabila biotehnologie moderna.

În prezent majoritatea țărilor lumii utilizează *levuri selecționate*, comercializate sub formă de *Levuri Uscate Active (L.S.A. - Levures Seches Actives)*.

♦ *Levurile Uscate Active în oenologie*

Originea lor se află în Olanda, care a produs pentru prima dată levuri uscate pentru panificație în 1869. Abia în 1977 au fost scoase pe piață primele levuri uscate (L.S.A.) pentru vinificație. Piața actuală a L.S.A. se situează în prezent în jurul valorii de 300 - 400 t pe an. Există firme specializate care produc asemenea L.S.A. într-o gamă sortimentală foarte vastă. Dintre acestea, cea mai puternică este compania canadiană Lallemand. Sortimentul de levuri produs de acestea în prezent este extrem de bogat. (tabelul 13.4).

Noile progrese din domeniul biologiei moleculare fac posibilă atât selecția și identificarea unor sușe valoroase de levuri pentru producere de L.S.A., dar și un control riguros al levurajului, pentru a putea verifica permanent eficiența aplicării acestuia.

Tabelul 13.4

Câteva preparate de levuri selecționate, comercializate în lume de compania Lallemand (Trioli G., 1993)

Codul sușei	Caracteristica oenologică
71 B	Sușă tipic aromatică, pentru vinuri tinere fabricate prin macerație carbonică
R 2	Sușă criofilă pentru finețea superioară a vinului
L 2056	Sușă pentru o bună extracție a culorii
CRU și CRUS	Pentru spumante de mare finețe
L 2226	Pentru vinuri roșii de mare marcă, înaltă toleranță la alcool
Z 663	Pentru spumante și refermentări
PMA	Aglomerante, pentru spumante tip "champenoise"
404	Sușă pentru vinuri albe și roșii, spumare redusă în timpul fermentației
TOKAY	Pentru eleganță și tipicitate
TRIER	Pentru vinuri albe de consum curent

♦ *Avantajele utilizării levurilor selecţionate sub formă de L.S.A.*

- uşurinţă de utilizare: însămânţare directă, cu economie de recipienţi destinaţi preparării maielei;

- numărul foarte ridicat şi cunoscut de celule reactivabile pe unitate de greutate, ceea ce permite calcularea şi încorporarea directă a cantităţii de levuri în funcţie de volumul de levurat;

- evitarea sărăcirii prea rapide a mustului în elemente nutritive;

- demarajul imediat al fermentaţiei şi ajungerea rapidă la primele valori ale alcoolului ce pot inhiba levurile apiculate producătoare de acizi volatili şi astfel buna controlare a fermentaţiei;

- fermentaţie mai regulată şi mai energică;

- pentru o cantitate identică de zahăr transformat în alcool, cantitatea de energie sau de calorii produse rămâne global aceeaşi, pe când în cazul florei indigene această cantitate de căldură este produsă în timpul unei durate mai scurte, ceea ce poate antrena o încălzire excesivă a mediului;

Aceasta duce şi la formarea de spumă în cantitate mare şi debordarea ei din cuvă.

- asigurarea unei fermentaţii complete cu obţinerea unei populaţii maxime la sfârşitul fazei exponenţiale (30 - 80 mil. levuri/ ml, la vinul alb şi 100 - 150 mil. levuri/ ml, la cel roşu).

O foarte bună floră indigenă nu poate duce la mai mult de 500.000 - max. 1 mil. levuri / ml (în cel mai bun caz), pe când o L.S.A. utilizată în doză de 20g / hl asigură 5 mil. levuri /ml.

- costul mic al levurajului:

Costul mediu al unui kg L.S.A. este de 20 $. Pentru un hl must se folosesc aproape 20g L.S.A., adică 0,2 g/l vin, ceea ce înseamnă o cheltuială de 0,4 $ /l vin.

Criterii de selecţie a levurilor oenologice şi rezultate obţinute în activitatea de ameliorare a acestora

a) Criterii tehnologice de selecţie a levurilor pentru vinificaţie (tabelul 5a)

- iau în considerare trăsături care influenţează parcurgerea procesului de fermentaţie a mustului

b) Criterii calitative de selecţie a levurilor pentru vinificaţie (tabelul 5b)

- iau în considerare trăsături biochimice care determină calitatea viitorului vin

Tabelul 13.5a

Criterii tehnologice de selecție a levurilor pentru vinificație (după M. Burcea, 2001)

Nr. crt.	Criteriul	Semnificația oenologică
1	Vigoarea fermentativă	-pornirea rapidă în fermentație pentru eliminarea O_2 care poate genera gusturi neplăcute -capacitatea de a realiza o fermentație completă a mustului la 20-30°C
2	Rezistența la anhidridă sulfuroasă	-capacitatea de a menține nealterată vigoarea fermentativă chiar în prezența acestui produs antiseptic, situație frecventă în anii cu recolte avariate când se impune o sulfitare mai energică
3	Producerea de etanol și toleranța la acesta	- capacitatea unei levuri de a transforma glucidele în alcool și de a rezista totodată la valori superioare ale etanolului format. Majoritatea suşelor cu putere fermentativă superioară duc la formarea a 14% şi chiar 18 - 20% vol. alcool.
4	Randamantul în alcool (g/ grad alcool)	- cantitatea de glucide consumată pentru a produce un grad alcool. Este considerată suşă cu un bun randament alcoolic aceea care foloseşte 16-17 g zahăr pentru producerea unui grad alcoolic.
5	Starea de activitate: caracterul pulverulent şi dezvoltarea floculantă (aglomerantă)	- caracterul pulverulent este dat de trăsătura de separare a celulelor fiice de celula mamă după înmugurire, ceea ce creează un depozit prăfos, dispersabil în mediul de fermentație şi care dă aspectul de turbiditate uniformă. -dezvoltarea floculantă se referă la capacitatea de a forma conglomerate celulare ce dau aspect de flocoane (aderente sau neaderente) în lichidul fermentat.
6	Capacitatea de sedimentare	- caracteristica de a forma un depozit compact la sfârşitul fermentației, care lasă lichidul clar, făcând posibilă o tragere uşoară a vinului de pe drojdii.
7	Criotoleranta	- capacitatea de a fermenta normal la temperaturi joase

8	Formarea spumei	- un strat gros de spumă ce se poate dezvolta în timpul fermentației tumultuoase nu este de dorit.
9	Caracterul "Killer"	- există suşe care produc o proteină capabilă să inhibe dezvoltarea suşelor din alte specii sau din aceeaşi specie care sunt sensibile la acțiunea ei. Sunt socotite killer-neutre acele suşe care nu produc această proteină, dar nici nu sunt sensibile la acțiunea ei.

Tabelul 13.5 b

Criterii calitative de selecție a levurilor pentru vinificație (dupa M.Burcea, 2001)

Nr. crt.	Criteriul	Semnificația oenologică
1	Producerea redusă de acididitate volatilă	- conținutul vinului în acizi volatili trebuie să fie cât mai redus
2	Producerea redusă de SO_2, H_2S etc.	-este dependentă de levură într-o foarte mare măsură. Majoritatea suşelor produc 8-15 mg/l de SO_2. Convențional se consideră lipsite de SO_2 acele vinuri care conțin mai puțin de 10 mg/l . - Levurile produc H_2S în proporție de aproximativ câteva mg/l
3	Producerea de acetaldehidă	- 30-50 mg/l este limita acestui compus într-un vin de calitate
4	Producția de glicerol	- valoarea optimă este între 4 şi 6 g/l

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5	Producția echilibrată de alcooli superiori	- n-propanol, izobutanol, amilol activ, izoamilol etc.
6	Descompunere a acidului malic	- aciditatea echilibrată este fundamentală pentru calitatea vinului. Dezacidifierea cu ajutorul unor suşe de levuri prin descompunerea acidului malic este un procedeu folosit în prezent în oenologia modernă
7	Capacitatea de autoliză la temperaturi joase	- este un proces hidrolitic sub acțiunea enzimelor levurii şi are o mare importanță în producerea spumantelor
8	Caracteristici organoleptice superioare	- în urma degustării, vinul obținut trebuie să fie de calitate superioară, fapt determinant în mare măsură de natura suşei levuriene

Rezultatele activității de selecție şi ameliorare a levurilor pentru vinificație sunt în prezent extrem de bogate atât pe plan mondial cât şi la noi în țară. Câteva dintre acestea sunt prezentate în tabelele 13.6 (a şi b).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.6a

Cateva rezultate ale activitatii de ameliorare a levurilor pentru vinificatie obtinute pe plan international (dupa M. Burcea, 2001)

Nr. crt.	Tipul suşei obţinute prin selecţie	Metoda de selecţie-ameliorare aplicată
1	"Levuri sulfitice" sau sulfitorezistente	-utilizarea variabilităţii genetice naturale -mutageneza
2	Levuri rezistente la pesticide	- utilizarea variabilităţii genetice naturale
3	Levuri alcoolorezistente sau "alcooligene"	- utilizarea variabilităţii genetice naturale - mutageneza - inginerie genetica (tehnica ADN recombinant)
4	Levuri "floculante"	- utilizarea variabilităţii genetice naturale - mutageneza
5	Levuri "criofile", "criotolerante" sau "levuri reci"	- utilizarea variabilităţii genetice naturale - mutageneza
6	Levuri "osmotolerante" sau "osmofile"	- utilizarea variabilităţii genetice naturale

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7	Levuri pentru vinuri speciale a) Levuri Xeres, Sherry sau peliculare - "flor del vino" b) Levuri pentru vinuri spumante	- utilizarea variabilității genetice naturale - utilizarea variabilității genetice naturale - mutageneza
8	Levuri care contribuie la îmbunătățirea calității vinurilor	- utilizarea variabilității genetice naturale - mutageneza - inginerie genetică (clonare genetică, fuziune de protoplaști)
9	Levuri "Killer"	- utilizarea variabilității genetice naturale - inginerie genetică

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.6b

Câteva suşe locale de levuri selecţionate prin utilizarea variabilităţii genetice naturale din cele mai reprezentative regiuni viti-vinicole europene (dupa M. Burcea, 2001)

Nr. crt.	Ţara de origine	Denumirea suşelor de levuri
1	Franţa	Levurile de Beaujolais Levurile pentru vinuri albe Vermentino-Corse Levurile de Cotes du Rhone Levurile de Charentes Levurile Ţării Nantului Levurile de Champagne Levurile indigene de pe Valea Loirei Levurile indigene de Cognac Levurile locale de Roussillon Levurile de Bordeaux 100 levuri locale franceze comercializate (L.S.A.V.)
2	Italia	Levuri indigene italiene (L.S.A.V.)
3	Elveţia	Levuri indigene L.S.A.V.
4	Spania	Levurile zonei Vall d'Albaida
5	Ucraina	Levurile regiunii subcarpatice ucrainene
6	Grecia	Levurile indigene ale Greciei
7	România	Levurile indigene româneşti Levurile podgoriei Dealu-Mare Levurile de pe Târnave Levurile de Murfatlar

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Berea

Aceasta este un produs de fermentație care pornește de la cereale: orz, grâu, orez. Amidonul și proteinele complexe conținute de substratul cerealier trebuie să fie transformat într-un amestec de glucide și acizi aminați, mai ușor utilizabili de către microorganisme. După cum se vede și în **figura 13.5**, boabele de orz sunt forțate să germineze. Sunt activate anumite enzime și se formează maltul de cereale, materia primă pentru fermentație. Maltul se amestecă cu apa și este trecut în cuve speciale unde se produce hidroliza amidonului în glucide simple. Mustul de braserie se supune unui proces de încălzire în prezența hameiului – *Humulus lupulus* (flori uscate). Acestea se introduc în must pentru a inhiba dezvoltarea unei microflore nefavorabile ce poate determina alterări nedorite. Hameiul are și un rol de aromatizant al substratului, dar el facilitează totodată și limpezirea mustului. În cursul încălzirii se inactivează enzimele hidrolitice. Mustul este imediat însămânțat cu levuri de joasă fermentație, denumite levuri de braserie, aparținând de regulă speciei *Saccharomyces carlsbergensis*. Problemele selecției și utilizării levurilor ameliorate în biotehnologia producerii berii îmbracă în linii generale, aceleași aspecte ca și acelea abordate la biotehnologiile vinicole.

După încheierea fermentației, drojdia se depune la fundul recipientului. La gustul berii contribuie și o serie întreagă de alți compuși chimici care rezultă din acest proces, cum ar fi gliceroli, acizi din diferite categorii etc. Levurile de joasă fermentație sunt capabile să produca în 7 – 12 zile de fermentație, beri cu un pH de 4,1 – 4,2. Levurile de înaltă fermentație, cum este cazul celor aparținând speciei *Saccharomyces cerevisiae* sunt folosite la producerea berii englezești. pH-ul determinat de aceste levuri este mult mai mic, de numai 3,8. Berea proaspăt ieșită din procesul de fermentație este supusă unui proces de afinaj sau învechire. Atunci când se trage în sticle pentru îmbuteliere se adaugă CO_2. Berea se supune de regulă unui proces de pasteurizare la 60°C sau chiar unui proces de sterilizare, prin trecerea prin membrane filtrante.

Odată înțeleasă schema generală de obținere a berii, vom prezenta în continuare tehnologia detaliată a obținerii berii în fabricile moderne pornind de la malt (figura 13.6).

Măcinatul cerealelor și brasajul (1)

Cerealele sunt măcinate, iar făina de malț este transportată cu cisternele și vărsată în cisterne inox de talie industrială. Aici ea este amestecată cu apa călduță. În trecut, această etapă era efectuată manual cu ajutorul unor furci cu care berarul amestecă ore în șir. Iată de ce astăzi furca berarului reprezintă simbolul acestei bresle. În braseria modernă cisternele sunt echipate cu un agitator complet automatizat. În cuvele de înmuiere din cupru, tehnologul aduce amestecul treptat la temperatura de 75 grade Celsius. Această încălzire duce la dizolvarea elementelor solubile din malț și conversia amidonului în maltoză (glucid solubil).

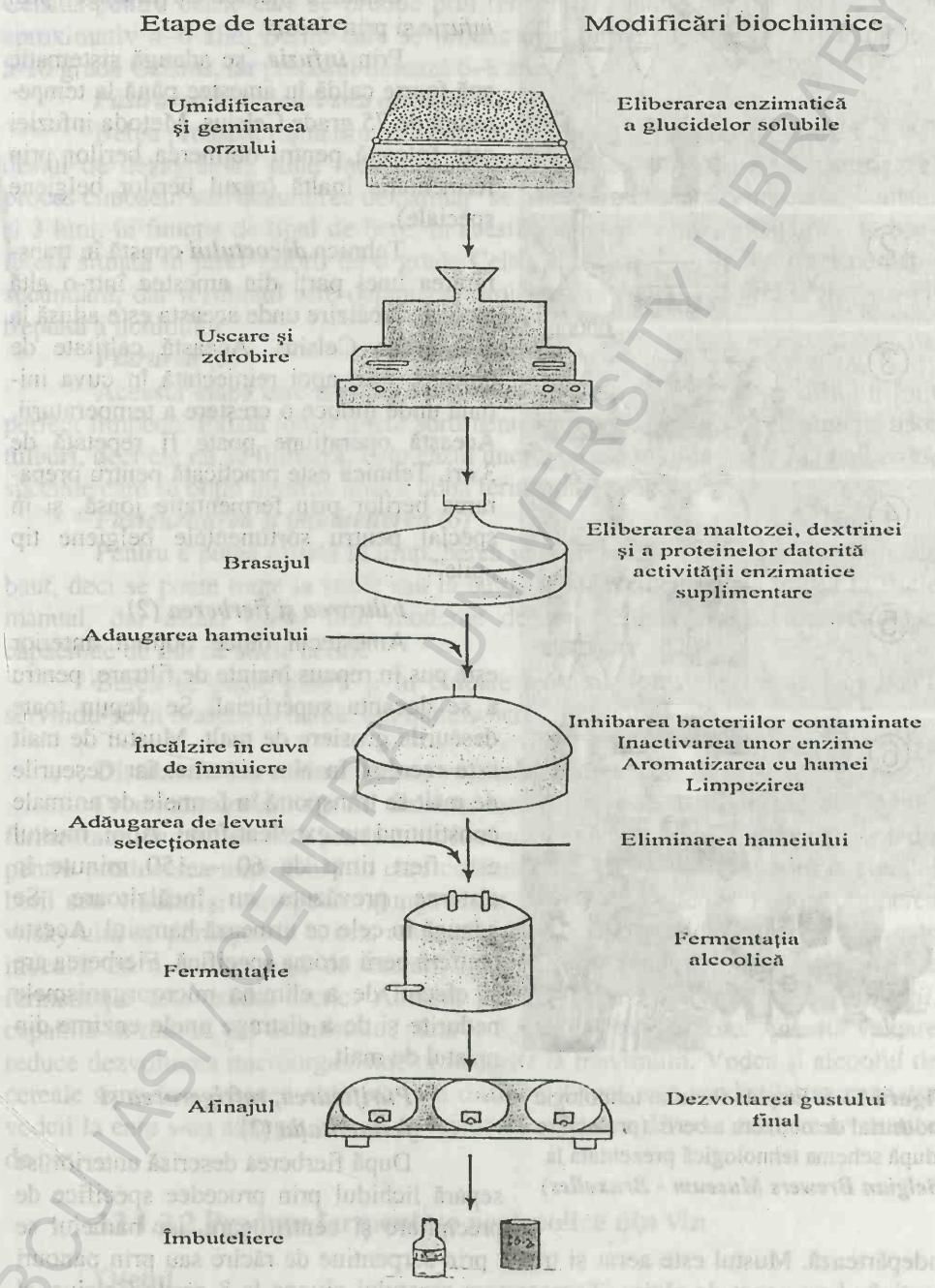


Figura 13.5. Schema generală de producere a berii cu evidențierea etapelor de tratare aplicate (stânga) și a modificărilor biochimice care au loc (dreapta); (prelucrare după Prescott, Harley și Klein, 1993)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

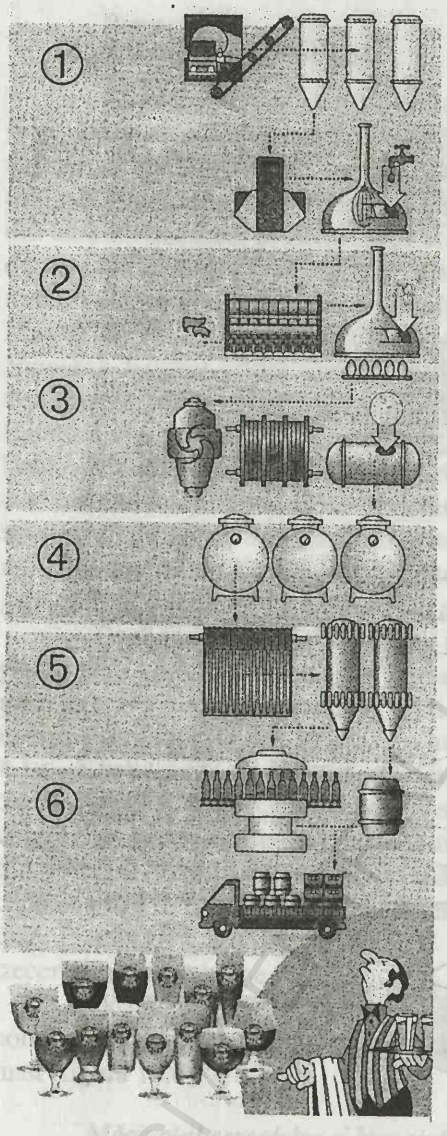


Figura 13.6. Etapele fluxului tehnologic industrial de obținere a berii (prelucrare după schema tehnologică prezentată la *Belgian Brewers Museum - Bruxelles*)

Există 2 metode de brasage: prin *infuzie* și prin *decoct.*

Prin ***infuzie*** se adaugă sistematic apă foarte caldă în amestec până la temperatura de 75 grade Celsius. Metoda infuziei este folosită pentru obținerea berilor prin fermentație înaltă (cazul berilor belgiene speciale).

Tehnica ***decoctului*** constă în transferarea unei parți din amestec într-o altă cuvă de încălzire unde aceasta este adusă la 100 grade Celsius. Această caltitate de amestec este apoi reinjectată în cuva inițială unde induce o creștere a temperaturii. Această operațiune poate fi repetată de 3 ori. Tehnica este practicată pentru prepararea berilor prin fermentație joasă, și în special pentru sortimentele belgiene tip „pils".

Filtrarea și fierberea (2)

Amestecul dulce obținut anterior este pus în repaus înainte de filtrare, pentru a se decanta superficial. Se depun toate deșeurile grosiere de malt. Mustul de malt este recoltat în alte cisterne, iar deșeurile de malt se transportă în fermele de animale constituind un excelent furaj. Apoi, mustul este fiert timp de 60 – 150 minute în cisterne prevăzute cu încălzitoare. Se adaugă în cele ce urmează hameiul. Acesta conferă berii aroma specifică. Fierberea are și efectul de a elimina microorganismele nedorite și de a distruge unele enzime din mustul de malt.

Purificarea, refrigerarea și fermentația (3)

După fierberea descrisă anterior, se separă lichidul prin procedee specifice de precipitare și centrifugare, iar hameiul se îndepărtează. Mustul este aerat și trecut prin serpentine de răcire sau prin panouri conținând un agent de răcire. Temperatura mustului ajunge la 8 grade Celsius, el fiind gata de a fi transferat în cuvele de fermentație. Aici se realizează conversia glucidelor în alcool etilic și acid carbonic. Altfel spus, mustul de malț se transformă în bere. Temperatura optimă de fermentație trebuie să fie între 15 și 25 grade

Celsius pentru berile care se produc prin fermentație înaltă, iar procesul durează aproximativ 4–6 zile. Berile care se produc prin fermentație joasă au nevoie de 5-10 grade Celsius, iar procesul durează 6–8 zile.

Pastrarea la tancuri sau afinajul(4)

Berea proaspat ieșită din fermentație, denumită și bere tânără, are un aspect destul de dezagreabil, fiind incă tulbure. De aceea ea trebuie să se maturizeze, proces cunoscut sub denumirea de „afinaj" se păstreaza în tancuri între 2 săptămâni și 3 luni, în funcție de tipul de bere. În acest interval de timp se asigură o temperatură situată în jurul valorii de 0 grade Celsius. Adesea are loc și o fermentație secundară, dar rezultatul este depunerea drojdiilor la fundul vasului și limpezirea treptată a lichidului.

Filtrarea (5)

Această etapă este esențială pentru a determina obținerea produsului finit perfect limpede. Există totuși unele sortimente de beri care trebuie să rămână ușor tulburi, deci ele nu se filtrează. Este cazul unor beri așa numite „albe" sau a berilor speciale care se obțin în urma unei a doua fermentații la sticlă.

Pasteurizarea și îmbutelierea (6)

Pentru a putea rezista în timp, berea se pasteurizează, ea devenind bună de baut, deci se poate trage la sticle sau la butoaie. În trecut berea se trăgea la sticle manual, dar astăzi există linii moderne de Îmbuteliere automatizate care au capacitate de mii de sticle la ora.

Berea se poate pastra și în butoaie inox sub presiune de acid carbonic servindu-se în braserii la halbă, așa numita bere „pression".

Distilatele din materii prime vegetale fermentate

Producția acestui tip de distilate este o extensie a producției de băuturi fermentate. După fierberea produsului fermentat se condensează compușii volatili pentru producerea unui lichid în care conținutul de alcool este superior aceluia al berii sau vinului și care poate ajunge chiar la 50% vol. alcool. Pentru obținerea wisky-ului se pornește de la orz, respectiv de la un must acid de cereale care este inoculat cu o anume sușă de bacterii homolactice al cărui produs principal de fermentație este acidul lactic. Această bacterie este *Lactobacillus delbrueckii*, capabilă să reducă pH-ul mustului până la 3,8 în numai 6-10 ore. Această valoare reduce dezvoltarea microorganismelor nedorite la maximum. Vodca și alcoolul de cereale sunt de asemenea obținute prin distilare. Ginul este un distilat asemanator vodcii la care s-au adaugat arome de rașinoase – adesea diverse extracte aromatice de pin.

13.1.2.2.Produse fermentate nealcoolice din vin

Oțetul

Este un vin acrit în mod intenționat cu ajutorul unor bacterii acetice, deci prin fermentație acetică. Fabricarea vinului, așa cum am mai arătat, este veche de peste 10 000 de ani, iar aceea a oțetului este la fel de veche, mai ales că de fapt,

este vorba despre o boală a vinului – oțetirea, care a condus chiar la descoperirea acestui produs. Babilonienii în anul 5000 Î.Hr. fabricau deja oțetul plecând de la Vinul de Palma. La rândul lui, oțetul a stat din cele mai vechi timpuri la baza a numeroase preparate culinare, conservând carnea, peștele, legumele sau fructele de sezon, a unor prăjituri sau condimente. În Biblie oțetul este descris ca fiind un produs cu proprietăți miraculoase, fiind folosit de alchimiști. În epoca medievală era folosit la prepararea mustarului, iar în medicină se intrebuința pentru tratarea plăgilor. În prezent se fabrică o multitudine de oțeturi. În țările producatoare de vin (Franța, Spania, Portugalia, Italia, America de sud etc) se utilizează adesea vinul de masă cu tărie alcoolică redusă ca materie primă pentru obținerea oțetului. În zonele pomicole unde cultura mărului este frecventă (Franța, Elveția, SUA, Canada) se pornește de la cidru, iar în Asia se utilizează orezul după zaharificarea amidonului din acesta si fermentația alcoolică. În Anglia si Scoția se produce oțet din malț sau din bere, iar in țările producătoare de fructe (grepfuct, banane, cocos, lamâi, mango), acestea se fermentează si constituie o materie primă uzuală pentru producerea de oțet. În lume se produc actualmente cantități situate in jurul valorii de 1 600 milioane litri de oțet alimentar de aproximativ 10% vol. Oțetul este astfel cel mai important produs acid de fermentație de origine microbiană.

Procedeele tehnologice de obținere a oțetului sunt foarte variate si s-au perfecționat de-a lungul anilor. Cel mai cunoscut este acela care constă in conversia spontană a vinului in oțet sub acțiunea bacteriilor acetice care se găsesc in microflora de pe fructe sau in aer, lasând pur si simplu vinul in contact direct cu aerul. Prin această tehnică, denumită „de Orleans", vinul materie primă se pune in butoaie umplute pe trei sferturi. Bacteriile aerobe din genul *Acetobacter* se dezvoltă la suprafața lichidului sub forma unui voal si transformă in mod natural alcoolul in acid acetic (**figura 13.7**). Metoda este utilizată in prezent numai pentru producerea de cantitati foarte mici de otet.

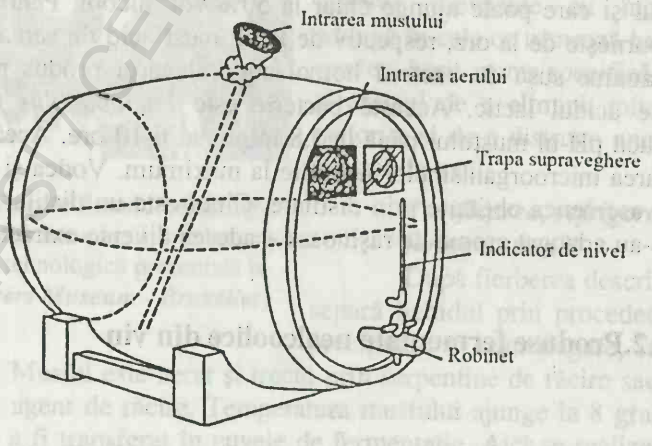


Figura 13.7. Schema tehnologică de preparare a oțetului prin procedeul „de Orleans" (după Bourgeois și Larpent, 1996)

Au fost puse la punct si perfecționate procedee rapide (**figura 13.8**). Într-un tanc inox vertical este introdus, deasupra unui strat de tocatură de lemn de fag, un jet de mediu de fermentație (vin). Lichidul in curs de acidificare este recirculat. Ameliorarea procedeului s-a făcut prin aerarea forțată și controlarea strictă a temperaturii. Aproximativ 30% din instalatiile de producție din lume funcționează încă în acest fel. Este un sistem de funcționare tip bioreactor cu un randament de 85-90%, adică o capacitate de transformare a 5 l etanol pe zi.

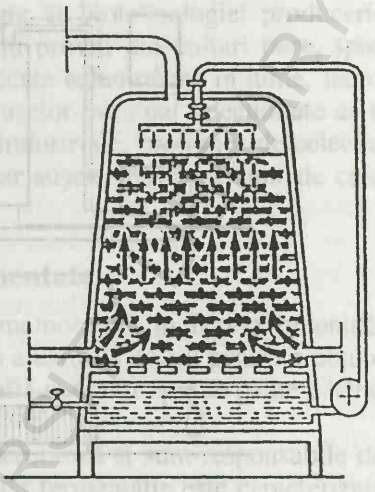


Figura 13.8. Procedeul rapid de acetificare a biomasei pe strat de tocatură de fag

În prezent se practică noi tehnici performante. Astfel, s-a perfecționat un ***bioreactor*** - denumit ***acetatorul Frings*** (**figura 13.9a și figura 13.9b**), care funcționează în prezent în cadrul a numeroase linii tehno-logice din lume. Cea mai recentă realizare tehnică este ***bioreactorul cu densitate celulară inaltă***, care este încă în curs de perfecționare.

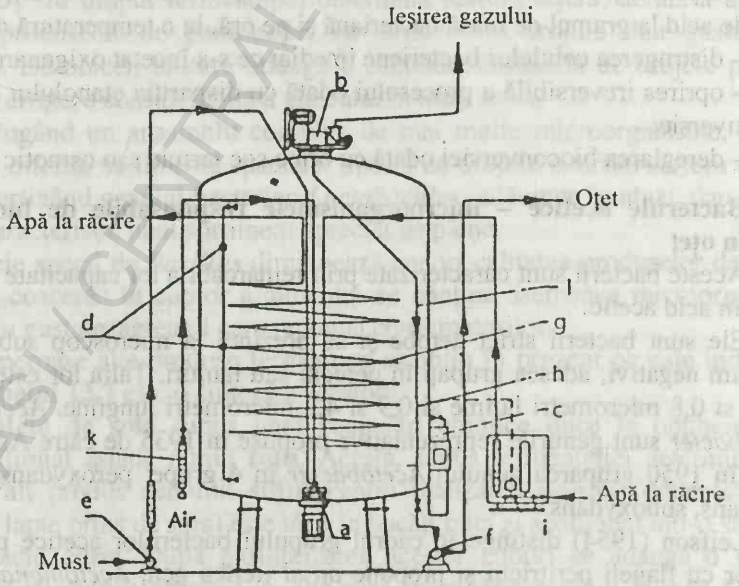


Figura 13.9a. Acetatorul Frings: a. Motor și aerator; b. Distrugător de spumă; c. Alcoolograf; d. Nivel de control; e. Pompa de intrare; f. Pompa de subtiraj; g. Circuit de răcire; h. Termometru; i. Vana de apă; j. Debitmetru de aer; k. Circuit de retur. (după Bourgeois și Larpent, 1996)

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

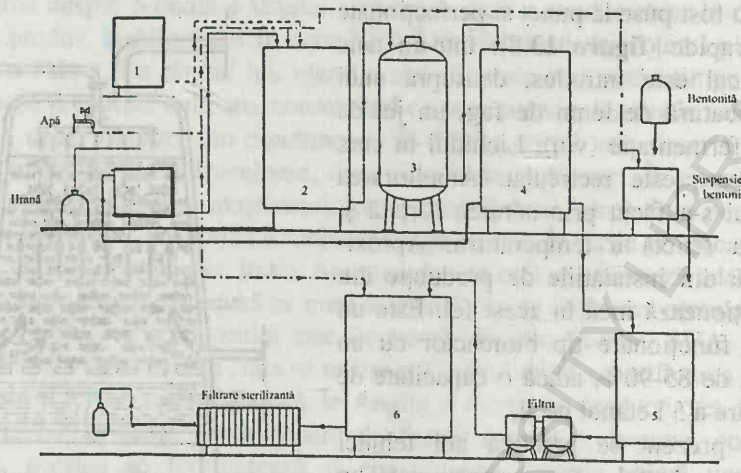


Figura 13.9b – Sinoptica fabricării oțetului prin tehnica acetatorului Frings sau a culturii submersionate (după Bourgeois și Larpent, 1996); 1. alcool, 2. must, 3. acetator, 4. recipient de stocare a oțetului nefiltrat, 5. limpezire, 6. recipient de stocare a oțetului filtrat;

Caracteristicile acestei tehnici, arătate de Hromatka și Ebner (1949, 1959, 1963) sunt:

– o producție remarcabilă de acid de către bacteriile acetice utilizate, egală cu 21 g de acid la gramul de masă bacteriană si pe oră, la o temperatură de 30°C;

– distrugerea celulelor bacteriene imediat ce s-a încetat oxigenarea;

– oprirea ireversibilă a procesului odată cu dispariția etanolului din mediul de bioconversie;

– dereglarea bioconversiei odată cu orice soc termic sau osmotic intervenit.

Bacteriile acetice – microorganismele responsabile de bioconversia vinului in oțet

Aceste bacterii sunt caracterizate prin remarcabila lor capacitate de a oxida etanolul în acid acetic.

Ele sunt bacterii strict aerobe și se prezintă la microscop sub forma de bacili gram negativi, adesea grupați în perechi sau lanțuri. Talia lor este variabilă, între 0,5 si 0,8 micrometri lățime și 0,9 si 4,2 micrometri lungime. *Acetobacter* și *Gluconobacter* sunt genurile reprezentative propuse în 1935 de către Asai. Frateur propune în 1950 gruparea genului *Acetobacter* în 4 grupe: peroxydans, oxydans, mesoxydans, suboxydans.

Leifson (1954) distinge în cadrul grupului bacteriilor acetice pe acela al bacteriilor cu flageli peritrichi și propune un al treilea gen, *Acetomonas*. În 1961 Carr și Shimwell, dar și Asai în 1968 propun înlocuirea genului *Acetomonas* cu *Gluconobacter*. Experiențele de hibridare efectuate de Gillis și De Ley (1980) au demonstrat că cele două genuri ar trebui regrupate în aceeași familie – *Acetobacteriaceae*. Această poziție a fost reținută și de către Bergey în manualul său de identificare a bacteriilor, ediția a 9-a.

În ceea ce priveşte aspectul microbiologic al biotehnologiei producerii oţetului, aceasta utilizează suşe bacteriene care nu provin din culturi pure, spre deosebire de alte biotehnologii fermentative practicate actualmente în lume, lucru datorat imposibilităţii de conservare a aptitudinii suşelor eventual selecţionate de a se impune în acest tip de fermentaţie. În condiţii industriale, presiunea de selecţie asupra microorganismelor este foarte puternică, iar suşele introduse sunt de cele mai multe ori eliminate total sau parţial.

13.1.2.3. Alte produsele vegetale fermentate

Produsele de panificaţie au o vechime memorabilă în istoria omenirii. Picturile egiptene din antichitate arată cum era pus aluatul la dospit pentru a obţine pâinea. Printre exponatele din British Museum se află şi eşantioane de pâine datând din anul 2000 î.Hr.

Levurile sunt acelea care se dezvoltă în aerobioză şi sunt responsabile de dospirea aluatului şi producerea pâinii. Acest tip de fermentaţie este caracterizată prin degajare de CO_2 fără producere de alcool.

Fermentaţia pâinii comportă mai multe etape:

– alfa şi beta amilazele prezente în aluatul umed, descompun amidonul în maltoză şi zaharoză.

– se adaugă o suşă levuriană de brutărie aparţinând speciei *Saccaromyce cerevisiae* care acţionează prin alte enzime (maltaza, invertaza, zimaza). Producerea de CO_2 în timpul fermentaţiei determină textura lejera, aerată a aluatului majorităţii produselor de panificaţie, iar urmele de drojdie dau gustul final caracteristic. De obicei, brutarii adaugă o cantitate suficientă de drojdie pentru a determina o creştere considerabilă a aluatului în timp scurt.

Adăugând un ansamblu complex de mai multe microorganisme, brutarii pot produce diferite sortimente speciale. Specia de drojdie *Saccharomyces exiguus* şi o suşă aparţinând genului bacterian *Lactobacillus*, adăugate în aluat, dau un gust uşor acid, caracteristic unui sortiment apreciat de pâine.

Unele specii de *Bacillus* diminuează uneori calitatea produselor de panificaţie. După coacerea în cuptor a aluatului ce conţine asemenea microorganisme, pâinea are un gust dezagreabil care repugnă consumatorilor.

Numeroase alte produse fermentate se obţin în prezent pe cale industrială în lume. **Tabelul 13.7** este o sinteză a acestora.

Laptele de soia supus unei coagulări chimice duce la obţinerea unui produs tradiţional asiatic numit **tofu**. Acesta, supus fermentaţiei determină obţinerea unui alt produs denumit **sufu**. Pentru realizarea acestei fermentaţii, tofu (obţinut din lapte prins de soia) este tăiat în bucăţi mici şi scufundat într-o saramură de sare şi acid citric. După pasteurizarea acestor cuburi se adaugă o suşă de *Actinomucor elegans* în amestec cu alte suşe aparţinând genului *Mucor*. Deîndată ce pe suprafaţa cuburilor apare un miceliu alb, aceste cuburi denumite în acest stadiu pehtze, sunt murate într-un vin de orez. Acest produs reprezintă în unele părţi ale globului un adevărat deliciu al gastronomiei tradiţionale.

Un alt produs popular este **tempeh**, obţinut din must de soia fermentat cu ajutorul unei suşe de *Rhizopus*.

Varza acră este de asemenea un alt produs tradițional de fermentație apreciat în țările europene.

Transformarea legumelor prin fermentație lactică este un procedeu cunoscut încă de pe vremea lui Plinius cel Bătrân (sec. I) care descrie procedeul conservării verzei prin sărare în ulcioare de lut bine închise pentru a evita intrarea aerului.

În prezent cercetările referitoare la modalitățile optime de dirijare a fermentației lactice în scopul obținerii prin murare a celui mai bun produs, îmbracă forme extrem de laborioase, fermentația legumelor fiind tratată ca orice altă biotehnologie fermentativă.

Astfel, pentru inducerea fermentației lactice a legumelor se folosesc în prezent culturi pure aparținând speciei *Lactobacillus plantarum.* Se folosesc două tehnici uzuale: opărirea fără sărare în care legumele sunt opărite în apă la 77°C timp de 3 minute, iar saramura nu conține sare și doar un tampon de acetat de calciu și sărarea fără opărire, în care legumele nu se opăresc, dar saramura conține și sare pe lângă acetat de calciu. Valoarea pH-ului saramurii înainte de inoculare este de 4,7. pH-ul final se ajustează pentru a ajunge la un optim de 3,5.

Numeroși cercetători au arătat utilitatea unor tulpini din speciile următoare: *Streprococcus termophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc dextranium* și *Leuconostoc mesenteroides.*

Tehnologia de obținere a produsului este prezentată în **figura 13.10.**

Varza este pusă la fermentat într-o saramură cu 2,2 – 2,8% clorură de sodiu care împiedică dezvoltarea bacteriilor Gram- și favorizează pe aceea a bacteriilor lactice din speciile *Lactobacillus mesenteroides* și *Lactobacillus plantarum.* Pe parcursul desfășurării acestei fermentații are loc o succesiune bine definită a microorganismelor implicate în această biotehnologie tradițională. Astfel, activitatea cocilor ce produc acid lactic încetează atunci când concentrația substratului în acest acid ajunge la 0,7 – 1%. În acest stadiu își încep activitatea *Lactobacillus plantarum* și *Lactobacillus brevis.* Un produs final de calitate atinge în general 1,6 – 1,8 % acid lactic, adică aproximativ 1 – 1,3% din aciditatea totală dezvoltată.

Tot în această categorie se pot include legumele fermentate prin procedee clasice, adică în saramură. **Castraveții murați** în saramură reprezintă un produs alimentar apreciat în țările balcanice, dar nu numai.

Se introduc castraveții împreună cu diverse condimente cum ar fi mărarul, enibaharul și altele, în butoaie cu saramură. Concentrația inițială de sare din această saramură este de 5% și poate ajunge până la 16%. Aceste concentrații inhibă bacteriile nedorite și extrag apa și alți compuși hidrosolubili din legume. Glucidele solubile sunt convertite în acid lactic. Durata fermentației poate fi cuprinsă între 10 și 12 zile si implică dezvoltarea speciilor bacteriene: *Leuconostoc mesenteroides, Enterococcus fecalis, Pediococcus cerevisiae, Lactobacillus brevis, Lactobacillus plantarum.* Această din urmă specie joacă un rol dominant în această fermentație. Adesea, în condiții industriale se practică o pasteurizare prealabilă pentru distrugerea microorganismelor naturale. Astfel se produce o saramură mult mai uniformă din punct de vedere tehnologic, care este însămânțată cu sușe pure de *Pediococcus cerevisiae* și *Lactobacillus plantarum.*

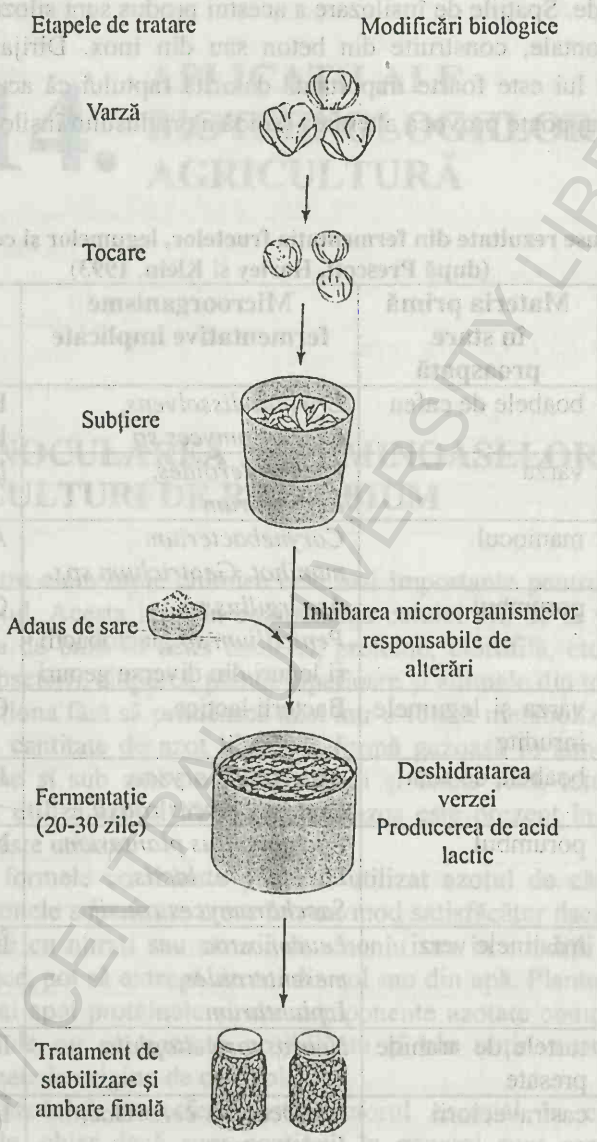


Figura 13.10. Producerea de varză acră prin fermentație lactică

Tot în această grupă a produselor fermentate de origine vegetală fac parte **furajele murate** pentru animale. Diferite specii de ierburi cu trăsături nutritive speciale pentru animale, porumbul și alte specii furajere se toacă și se supun unei fermentații mixte de tip lactic. Se produce așa-numitul furaj de siloz care poate asigura o hrană vegetală de bună calitate și foarte aromată pentru animale în timpul iernii, metoda fiind practic o modalitate de conservare a acestora în condiții

UASVM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

anaerobe umede. Spațiile de însilozare a acestui produs sunt silozurile verticale sau tranşeele orizontale, construite din beton sau din inox. Dirijarea procesului şi supravegherea lui este foarte importantă datorită faptului că acumularea de acizi organici în furaj poate provoca alterarea rapidă a produsului însilozat.

Tabelul 13.7.

Produse rezultate din fermentația fructelor, legumelor şi cerealelor (după Prescott, Harley si Klein, 1993)

Produs final	Materia primă în stare proaspată	Microorganisme fermentative implicate	Regiunea geografică de origine
Cafeaua	boabele de cafea	*Erwinia dissolvens, Saccharomyces sp*	Brazilia, Congo, Hawai, India
Varza acră	varza	*L.mesenteroides, L.plantarum*	Intreaga lume
Gari	maniocul	*Corynebacterium manihot, Geotrichum sp.,*	Africa de vest
Kenkey	porumbul	*Aspergillus sp., Penicillium sp.*, lactobacili şi levuri din diverse genuri	Ghana, Nigeria
Kimchi	varza şi legumele inrudite	Bacterii lactice	Coreea
Miso	boabele de soia	*Aspergillus oryzae, Saccharomyces rouxii,*	Japonia
Ogi	porumbul	*Lactobacillus plantarum, Lactococcus lactis, Saccharomyces rouxii*	Nigeria
Maslinele murate	maslinele verzi	*Leuconostoc mesenteroides, L.plantarum*	Întreaga lume
Ontjom	turtele de arahide presate	*Neurospora sitophila*	Indonezia
Murăturile	castraveciorii	*Pediococcus cerevisae, L.plantarum*	Întreaga lume
Poa	rădăcinile de taro	bacterii lactice	Hawai
Sosul de soia	boabele de soia	*Aspergillus oryzae, A.soyae, S.rouxii, Lactobacillus delbrueckii*	Japon
Sufu	boabele de soia	*Mucor sp.*	China
Tao-si	boabele de soia	*A.oryzae*	Philippines
Tempeh	boabele de soia	*Rhizopus oligosporus, P.oryzae*	Indonezia, Noua Guinee, Surinam

14. APLICAȚII ALE BIOTEHNOLOGIILOR ÎN AGRICULTURĂ

14.1. INOCULAREA LEGUMINOASELOR CU CULTURI DE RHIZOBIUM

Unul dintre elementele chimice cele mai importante pentru toate formele de viață este azotul. Acesta intră în componența celulei vii, de la virusuri la om, fiind componenta de bază în acizi nucleici, proteine, clorofilă, etc. Prin urmare, toate formele de bacterii, ciuperci, plante superioare și animale din toate speciile nu pot crește și funcționa fără să primească azot într-o formă metabolizabilă. Cu toate că există o mare cantitate de azot liber sub formă gazoasă în atmosfera terestră, dizolvat în oceane și sub ambele forme în sol și unele roci, totuși, plantele și animalele nu pot utiliza azotul liber. Azotul gazos este prezent în aer, în țesutul plantelor, dar nu este utilizat.

Doar în formele combinate poate fi utilizat azotul de către majoritatea organismelor. Plantele superioare cresc într-un mod satisfăcător dacă rădăcinile lor sunt aprovizionate cu nitrați sau sărurii de amoniu sau în condiții naturale, dacă sunt specii acvatice, pot să extragă azotul din sol sau din apă. Plantele pot sintetiza aminoacizii și mai apoi proteinele și alte componente azotate complexe, necesare creșterii. Animalele nu au această posibilitate și ele obțin azotul consumând proteinele sintetizate la origine de către plante.

Fixarea azotului atmosferic este factorul esențial în ciclul azotului. Procesele naturale, chiar dacă sunt continui, în general sunt prea lente pentru regiunile cu producție agricolă intensivă. Fixarea fizică prin fulger și ploaie, fixarea chimică prin vulcani, ceață naturală sau produsă de om, emanațiile industriale și din transporturi, precum și fixarea biologică au fost recent estimate și sunt prezentate în tabelul 14.1.

Cantitatea de azot fixată artificial (de către om) rezultă din aceste date că echivalează doar cu o jumătate din cantitatea fixată prin mijloace naturale. Totuși, fixarea artificială a azotului produce o modificare substanțială a ciclului azotului în ecosistemul natural.

Raportat la fixarea naturală, pajiştile constituie principala sursă de azot fixat, iar o altă parte importantă a acestuia provine din fixarea de către leguminoase. Neleguminoasele furnizează de asemenea o proporţie substanţială de azot fixat natural.

Tabelul 14.1

Estimarea fixării totale a azotului

Localizare sau mecanism de fixare	Azot fixat	
	Kg / an x 10	% din total
AGRICULTURĂ, din care:	**89**	**37,6**
1. Culturi de leguminoase	35	14,8
2. Culturi de neleguminoase	9	3,8
3. Pajişti	45	19,0
PĂDURI	**50**	**21,1**
PĂMÂNT NEUTILIZAT	**10**	**4,2**
OCEANE	**1**	**0,4**
ATMOSFERĂ	**10**	**4,2**
COMBUSTIE	**20**	**8,4**
FIXARE DE AMONIU INDUSTRIAL, din care:	**53**	**42,1**
1. Utilizat ca îngrăşământ	39	16,5
2. Utilizări industriale	11	4,6
3. Pierderi	7	3,0
TOTAL	**237**	**100**

Importanţa leguminoaselor în stabilirea şi păstrarea fertilităţii solului a fost recunoscută de la începutul agriculturii. Cu dezvoltarea noilor tehnici de a detecta capacitatea de fixare a azotului, au fost identificate un număr mare de specii şi sisteme capabile să fixeze azotul.

Aceste specii şi sisteme conţin organisme libere precum bacteriile şi algele albastre-verzi; sisteme simbiotice precum *Rhizobium*–leguminoase, angiosperme–actinomicete, asociaţii de alge albastre–verzi şi sisteme asociative precum rizosfera, filosfera şi lichenii. Toate aceste sisteme au o caracteristică în comun: proprietatea de a utiliza azotul, dar diferă prin fiziologie, structură metabolică şi caractere genetice.

În acest capitol vom trata posibilitatea de a mări capacitatea de fixare a azotului atmosferic de către leguminoase prin inocularea semințelor lor cu bacterii din genul *Rhizobium.*

Genul *Rhizobium* conține acele bacterii capabile să formeze noduli pe rădăcinile familiilor de leguminoase și neleguminoase și să fixeze azotul atmosferic.

În a opta ediție a manualului de taxonomie al lui Bergey în bacteriologie, *Rhizobium* este dat ca unul dintre cele două genuri care formează *familia Rhizobiaceelor.* Al doilea gen este *Agrobacterium.* Cele două grupuri de bacterii produc hipertrofii corticale la plante. *Rhizobium* formează în principal noduli pe rădăcinile leguminoaselor dar și pe rădăcinile neleguminoaselor, de exemplu: *Trema și Zygophillum.*

Agrobacterium produce nodozități dezorganizate la numeroase specii de plante. Specia tip pentru genul *Rhizobium* este *Rhizobium leguminosarum.* Speciile sunt clasificate pe baza preferinței plantei gazdă. Astfel se disting următoarele grupe:

SPECII	PLANTE PREFERATE
Rhizobium leguminosarum	*Pisum, Vicia, Lathyrus, Lens;*
Rhizobium trifolii	*Trifolii;*
Rhizobium phaseoli	*Phaseolus vulgaris;*
Rhizobium meliloti	*Medicago, Meliloti, Trigonela;*
Rhizobium lupini	*Lupinus, Ornithopus;*
Rhizobium japonicum	*Glicine max.*

Enzima care conferă speciilor de *Rhizobium* proprietatea de a fixa azotul liber din atmosferă se numește nitrogenază, și cataliozează reducerea azotul în amoniac. Aceasta se compune din două părți:

- feroproteina sau azoferodoxina, sau componenta I
- molibdoferoproteină, sau componenta II.

Cele două componente catalizează reducerea azotului doar dacă sunt combinate. Este posibilă chiar o reacție încrucișată între feroproteina-nitrogenază dintr-un organism și molibdoferoproteină din alt organism pentru a rezulta nitrogenază activă.

Feroproteina este cea mai mică dintre cele două și are o greutate moleculară de 50000-70000, este extrem de sensibilă la inactivarea de către oxigen, pierzând peste 70% din activitate dacă este expusă 1 minut la aer. Este labilă la frig și este alcătuită din două subunități, are 4 atomi de fier și 4 grupări sulfidril labile, similare ferodoxinei.

Molibdoferoproteina este mai mare, are o greutate moleculară de 100000-300000. Este mai puțin sensibilă la oxigen decât feroproteina. Nu este labilă la frig, este compusă și ea din două subunități.

Pentru a se produce fixarea azotului trebuie satisfăcute următoarele cerințe:
- sistemul complet al enzimei nitrogenază;
- o sursă de adenozin trifosfat (ATP);
- protecția enzimei împotriva inactivării de către oxigen;
- transportul rapid al azotului fixat de la locul fixării azotului pentru a evita inhibarea nitrogenazei prin produs finit (feed-back).

În mare parte din existența lor, bacteriile din genul *Rhizobium* supraviețuiesc libere în sol. Ele supraviețuiesc și în absența unei leguminoase gazdă. Un fenomen interesant apare când rădăcina unei leguminoase specifice se dezvoltă în mediul de viață a bacteriilor *Rhizobium* libere în sol. Este un fenomen de recunoaștere reciprocă între cei doi parteneri compatibili. Rădăcina leguminoasei recunoaște specific doar speciile din genul *Rhizobium* dintre toate celelalte bacterii, și acceptă doar specia specifică dintre alte specii de *Rhizobium* care se găsesc în apropiere. Bacteria, la rândul său recunoaște doar rădăcinile leguminoasei pentru care are specificitate, dintre alte rădăcinile care se pot prezenta în acel mediu.

14.1.1. Macrosimbiontul - leguminoasele

Familia Leguminoase este un grup de plante cu flori care cresc în zonele temperate și tropicale. Ea cuprinde mai multe tipuri de plante: plante mici, larg răspândite, de exemplu trifoiul; plante cu flori, de exemplu lupinul; plante de tufiș, de exemplu: de la măturice până la arbuști și arbori.

Familia a fost împărțită în trei subfamilii principale:

- *Papilionaceae*
- *Mimozaceae*
- *Caesalpinaceae.*

14.1.1.1. Specii cu inoculare încrucișată

Speciile de leguminoase care pot să interacționeze cu aceeași specie de *Rhizobium* și între care bacteriile fixatoare de azot pot să migreze, sunt cunoscute ca specii cu inoculare încrucișată. Mai jos sunt prezentate câteva exemple:

Tabelul 14.2

Grupul lucernă

Nume comun	Denumire științifică
Lucernă comună	*Medicago sativa*
Lucernă ungurească	*Medicago arabica*
Trfoi mărunt	*Medicago lupulina*
Lucernă pitică	*Medicago minima*
Sulfină	*Medicago indica*

Tabelul 14.3

Grupul trifoi

Nume comun	*Denumire științifică*
Trifoi hibrid	*Trifolium hybridum*
Trifoi alb	*Trifolium repens*
Trifoiul roșu	*Trifolium pratense*
Trifoiul unguresc	*Trifolium pannonicum*

Tabelul 14.4

Grupul mazăre

Nume comun	*Denumire științifică*
Mazăre sălbatică	*Pisum sativum (var arense)*
Măzăriche comună	*Vicia sativa*
Măzăriche de Rusia	*Vicia vilosa*
Mazăre furajeră	*Pisum arvense*
Sângele voinicului	*Lathyrus odoratus*
Lintea	*Lens culinaris (esculenta)*

Tabelul 14.5

Grupul fasole

Nume comun	*Denumire științifică*
Fasole comună	*Phaseolius vulgaris*
Fasole spaniolă	*Phaseolus cocineus*

Tabelul 14.6

Grupul lupin

Nume comun	**Denumire științifică**
Lupin	*Lupinus angustifolius*
Lupinul alb	*Lupinus albus*
Lupinul washington	*Lupinus polyphyllus*
Lupinul tânăr	*Lupinus luteus*

Grupul soia

Aici intră toate varietățile de soia. *Glicine max (Soja max)*

14.1.1.2. Nodulii

Datele de literatură care indică prezența nodulilor pe rădăcinile de leguminoase sunt foarte vechi, ajungând la niște desene ale rădăcinilor de leguminoase datând din sec. al XVI – lea, când Dalechamp (în 1586) remarca nodulii abundenți de pe *Ornithpodium tuberosum.*

a. Stadiul de preinfecție

Un subiect controversat este natura și specificul reacției care produce curbura pe rădăcina leguminoasei. *Young, J.* P. W., și K. E. Haukka. (1996) au distins gradele de curbură și au constatat că curbura caracteristică sub formă de cârje este produsă doar de către bacteriile capabile să infecteze rădăcina, în timp ce acidul indolacetic produce doar o deformare obișnuită.

Anumiți cercetători pretind că poligalacturonaza joacă un rol în procesul de infecție în timp ce alții au repus în discuție acest principiu. Cantități mici de enzimă produsă de către gazdă și detectată în rizosferă sunt induse doar de către bacteriile omoloage sau de grupări bacteriene de polizaharidă și această enzimă joacă un rol în infecție.

Fitoaglutininele (sau lectinele) pot fi implicate în procesul de infecție. Aceste substanțe sunt proteine cu afinități specifice pentru polizaharide. De asemenea, s-au constatat și anumite proprietăți litice. Aceste substanțe sunt de obicei întâlnite în semințele leguminoaselor. Fitoaglutininele din soia aglutinează cea mai mare parte a bacteriilor *Rhizobium* care produc simbioză cu soia. S-ar putea ca aceste substanțe să joace un rol deosebit în fenomenul de atașare specifică a bacteriilor de gazda lor.

Totuși, s-a constatat că la alte leguminoase această specificitate a fitoaglutininelor nu se păstrează. Anumiți cercetători au afirmat că lectinele denudează bacteria de învelișul său de polizaharidă și permit astfel o legătură mai strânsă între bacterie și gazdă.

Recent a fost demonstrată implicarea polizaharidelor în procesul de infecție. Macromolecule de poliglicani legate β1-3 se formează la extremitățile perișorilor absorbanți în dezvoltare și sunte implicate în anumite răspunsuri ale plantelor la invazia microbiană.

b. Zone de infecție pe rădăcini

Infecția rădăcinilor de leguminoase se produce doar în anumite zone temporar sensibile.

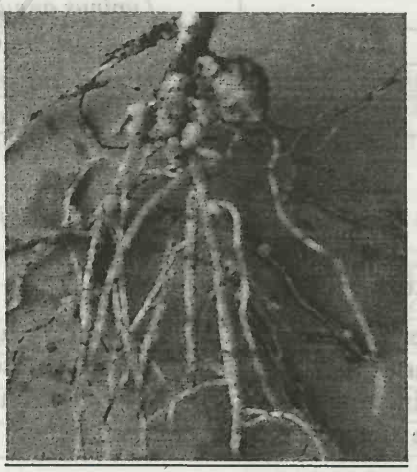


Figura 14.1. Nodozități produse de *Rhizobium trifolii* pe rădăcina trifoiului

c. Cordoanele de infecţie

Infecţia perişorilor absorbanţi, după penetrarea iniţială continuă prin dezvoltarea unui filament a cărui suprafaţă internă este învelită de un strat celulozic. Acesta închide bacteriile Rhizobium plasat cap la cap de obicei într-un şir polizaharidic. Dezvoltarea acestui tub, cordonul de infecţie, a fost documentată prin micrografia de baleaj.

Dezvoltarea cordonului de infecţie la trifoi este asociată cu o densitate crescută şi cu o scurgere. În circa patru ore învelişul cordonului de infecţie refringent este vizibil şi nucleul perişorului absorbant care şi-a dublat acum dimensiunea rămâne aproape de extremitatea cordonului care creşte. Nucleul se îndepărtează de extremitatea cordonului şi acesta îşi va înceta creşterea şi va expulza.

d. Iniţierea nodulului

Cordonul de infecţie penetrează în diagonală şi între celulele corticale ale rădăcinii până la bază. Schimbând temperatura rădăcinii sau întinzând inocularea se poate determina formarea unor noi noduli, astfel se vor forma şi pe rădăcini laterale. Nodulii sunt integraţi în fiziologia plantelor şi din această cauză sunt sensibili la schimbări care afectează nutriţia, fotosinteza, translocaţia, fotoperiodismul şi efectele fotochimice.

Anatomic, un nodul este format din:

- *Cortexul nodular:*

Acest ţesut cuprinde 4- 10 straturi celulare externe ale parenchimului neinfectat. Se distinge uşor faţă de cortexul rădăcinii prin celulele compacte şi de mărime mai mică.

- *Zona meristemică:*

Această parte constituie zona de creştere a nodulului. Ea consistă în celulele aflate în stare de diviziune activă şi creştere. În această parte, procesul de formare tisulară este continuu atâta timp cât nodulul este funcţional. Toate ţesuturile specializate din interiorul nodulului sunt originare din diferenţierea celulară din interiorul meristemului.

Amplasarea, mărimea, şi durata de viaţă a acestei zone variază în funcţie de specia gazdă. Poziţia acestei zone determină forma şi în anumită măsură, mărimea nodulului. Sunt cunoscute în general trei tipuri de meristem nodular în funcţie de poziţie:

- Emisferic – precum în nodulul de fasole, soia unde diviziunea celulară egală de-a lungul suprafeţei periferice produce o îngroşare radiară.

- Apical- existent în nodozităţile alungite, cu forme neregulate de la lucernă şi trifoi.

- Bilateral- întâlnit la nodulii de *Lupinus* unde creşterea orizontală în direcţii opuse produce o hipertrofie a ţesutului care tinde la încercuirea rădăcinii.

Sistemul vascular - acest ţesut serveşte la transportul elementelor nutritive spre nodul şi înapoi la transportul substanţelor azotate şi a altor subproduse ale metabolismului de *Rhizobium* spre planta gazdă.

Zona bacteroizilor - această parte, situată în centrul nodozității este adevăratul țesut bacterian. Este locul procesului de fixare a azotului.

14.1.2. Obținerea inoculantului

Inocularea leguminoaselor constă în administrarea de bacterii fixatoare de azot viabile pe suprafața semințelor de leguminoase înainte de însămânțare, cu scopul de a facilita fixarea simbiotică a azotului atmosferic. Inițial au fost folosite culturi pure de *Rhizobium* pe medii gelozate încă din 1896 de către Nobe și Hiltner. Ulterior, au fost utilizați inoculanți constând în sol steril impregnat cu culturi de *Rhizobium*, iar apoi a fost folosită turba ca suport pentru culturile de *Rhizobium* folosite la inoculare.

Nu există nici o îndoială că inocularea semințelor de leguminoase cu bacterii fixatoare de azot este necesară pentru toate terenurile agricole din lume. Însă, inocularea va avea efecte radical mai bune în următoarele condiții:

1. când pe terenul respectiv nu a mai fost cultivată înainte o leguminoasă;
2. când cultura precedentă de leguminoase nu a prezentat o bună nodulație;
3. în rotația de cultură care însoțește sau urmează o plantă neleguminoasă;
4. când solul a fost utilizat abuziv sau a fost valorificat în condiții neprielnice;

Există șase tipuri de inoculare în funcție de modul de prezentare al inoculantului cu *Rhizobium*:

1. pudră de turbă;
2. culturi lichide;
3. culturi pe medii gelozate;
4. culturi uscate (liofilizate sau atomizate);
5. culturi incorporat în pudră de talc;
6. inoculant sub formă de granule.

14.1.3. Selecția tulpinilor folosite la inoculare

Selecția tulpinilor de *Rhizobium* cu eficacitate crescută este una dintre condițiile principale pentru a produce un inoculant de bună calitate. O tulpină trebuie să fie capabilă să formeze nodozități fixatoare de azot eficace pe rădăcinile gazdelor pentru care este recomandată în diferite condiții de mediu. Celelalte caracteristici importante se referă la capacitatea de a forma noduli, supraviețuirea și multiplicarea în sol, mai ales în absența unei gazde. Criteriile adiționale se referă la nodulația rapidă și eficace la temperaturi specifice solului; o bună capacitate de multiplicare în medii de cultură; creșterea și supraviețuirea pe turbă sau alte materiale folosite ca suport; supraviețuirea pe semințe; toleranța la pH și pesticide; nodulație în prezența azotului combinat.

Datele de literatură indică două moduri de abordare pentru izolarea de noi tulpini specifice de *Rhizobium* pentru leguminoase sau stabilirea unei noi colecții de tulpini:

1. Dacă specia de leguminoase este nou introdusă în cultură, nodulii trebuie să fie recoltați deodată cu plantele pentru ca microbiologii să poată izola bacteriile *Rhizobium*, să le testeze în laborator și apoi să le furnizeze sub formă de inoculant.
2. Semințele neinoculate ale noilor specii introduse în cultură pot fi semănate în diferite locuri în speranța că tulpinile indigene de *Rhizobium* vor forma noduli eficienți din care vor putea fi izolate tulpini specifice de *Rhizobium*.

După ce au fost izolate, tulpinile de *Rhizobium* destinate obținerii de inoculant pentru leguminoase trebuie să fie evaluate în ceea ce privește următoarele caractere:

1. examinarea eficacității în fixarea azotului;
2. testarea tulpinii selecționate pentru capacitatea de a fixa azotul în condiții de teren, incluzând competența de a forma noduli, persistența și capacitatea de colonizare;
3. testul de toleranță la pH și pesticide, supraviețuirea în cultură și pe semințe;

Culturile în medii controlate, în sere, culturi aseptice de plante în recipiente cu nisip furnizează informațiile necesare pentru stabilirea eficienței tulpinilor de bacterii fixatoare de azot în ceea ce privește fixarea azotului și formarea nodulilor. De asemenea, pot fi utilizate eșantioane de culturi pe sol intact (obținute prin introducerea unei cutii goale în sol).

Activitatea în culturi agricole reprezintă ultimul test pentru evaluarea unei tulpini de *Rhizobium* știindu-se că proporția de noduli formați și cantitatea de azot fixat constituie rezultatul final obținut prin combinarea tuturor factorilor interactivi. Eficiența este măsurată fie direct, determinând cantitatea de azot fixat, fie indirect, determinând cantitatea de substanță uscată a plantei.

14.1.4. Multiplicarea bacteriilor fixatoare de azot

Culturile submerse de *Rhizobium* în medii lichide sunt cel mai des utilizate de către producătorii de inoculant pentru leguminoase. Etapele de cultivare pornesc de la nivel de laborator, în flacoane de sticlă conținând câțiva mililitri de cultură, până la bioreactoare special construite, conținând câteva mii de litri de mediu lichid. În general, etapele obținerii unei culturi de bacterii fixatoare de azot pot fi sintetizate după cum urmează. Culturi stoc, aflate în tuburi pe medii gelozate sunt transferate în fiole care conțin medii agarizate cu extras de drojdie și/sau manitol. După 3-5 zile de incubație la 25°C preinoculul este gata de folosire. Bacteriile sunt spălate de pe suprafața mediului și această suspensie constituie inoculul care va fi transferat în fermentatoare intermediar de câteva zeci de litri (exemplu concret 45 litri).

Mediul de biosinteză pentru culturile de *Rhizobium* variază în funcție de tulpina folosită. La bază se află extractul de drojdie și zaharoză împreună cu o soluție de săruri minerale. Mediul este preparat și sterilizat în fermentatoare individuale. După răcirea mediului la 27°C se adaugă inoculul. Se introduce și se difuzează aer steril pe la fundul recipientului printr-un dispozitiv de distribuție și dispersie a aerului din oțel inoxidabil (vezi Tratat de Biotehnologie Vol.1, capitolul Bioreactoare, subcapitolul Bioreactoare pentru cultivare în sistem submers). Durata medie a unui proces de biosinteză a biomasei de *Rhizobium* este de 72 de ore. La sfârșitul acestei perioade lichidul de cultură conține în jur de 5000 x 10^6 bacterii/ ml.

Culturile lichide ieșite din fermentatoarele intermediar sunt utilizate ca inocul pentru fermentatoare de regim de mii litri capacitate (în exemplul nostru, cei 45 litri din fermentatorul intermediar vor fi folosiți pentru inocularea a 1800 litri mediu în fermentatorul de regim).

Din nou sunt necesare 72 de ore pentru a atinge numărul de 5000 x 10^6 bacterii/ ml. Fermentatoarele variază de la cele cu conținut mare (1000 - 2000 litri) până la simple fiole sau rezervoare (10 - 100 litri).

14.1.5. Excipienți sau suporturi pentru inoculanți cu *Rhizobium*

Primele inoculări artificiale erau culturi bacteriene lichide adăugate semințelor sau direct în sol. Chiar dacă rezultatele au fost uneori nesatisfăcătoare, suspensiile lichide obținute prin spălarea unei culturi de *Rhizobium* mediu gelozat au fost utilizate mult timp. Totuși, studiile comparative făcute între culturile lichide și produsele inoculant obținute pe suport de turbă confirmă superioritatea celor din urmă. Protecția conferită de turbă pentru bacteriile *Rhizobium* după inoculare lor pe semințele de leguminoase a dus la renunțarea folosirii de culturi lichide.

Au fost făcute numeroase încercări pentru a produce inoculanți pe diferite suporturi, materiale care au dat rezultate bune au fost urmatoarele: turbă, turbă și cărbune, humus și cărbune de lemn, turbă sau humus îmbunătățit cu materiale precum pudră de lucernă, paie măcinate, drojdie (ca elemente nutritive pentru bacteriile din produsul inoculant); humus cu făină de soia.

Au fost încercate și alte materiale suport pentru *Rhizobium*: perlită descompusă și composturi de pleavă de orez, fosfat natural, compost de subproduse din industria cafelei, porumb măcinat și îmbogățit cu elemente nutritive; inoculant cu suport de cărbune, bentonită.

În ciuda tuturor încercărilor de a înlocui turba ca suport, inoculanții pe bază de turbă au dat cele mai bune rezultate. Majoritatea celorlalte suporturi potențiale au fost studiate în detaliu, dar nu par să posede proprietăți superioare turbei. În plus multe dintre aceste materiale nu sunt disponibile tot timpul sau nu sunt ușor accesibile. Cu siguranță căutarea de noi materiale folosite ca suport a fost indusă de lipsa turbei în acea zonă sau în acea perioadă, iar celelalte materiale examinate erau disponibile în regiunile respective.

14.1.5.1. Tratamentul prealabil al suporturilor

Factorii cei mai importanți care trebuie luați în considerare înainte de a alege o anumită turbă ca suport sunt sursa și caracterul materialului. Pentru că alegerea suportului depinde de compoziția lui chimică, este necesară testarea multiplicării culturilor de *Rhizobium* în mediu cu turbă.

Cea mai mare parte a suporturilor de turbă sunt bogate în materie organică, dar aceasta nu este o caracteristică esențială pentru un bun inoculant.

Uscarea turbei este o etapă importantă a preparării inoculantului. S-a demonstrat că la turba de Australia temperatura finală de uscare nu trebuie să depășească 100°C pentru a evita formarea de produse toxice și creșterea excesivă a temperaturii atunci când turba este umezită prin adăugarea suspensiei bacteriene. Cercetările (Bulletin Pedologique de la FAO no. 49) au descris obținerea unui inoculant de înaltă calitate printr-o uscare a suportului de turbă cu aer cald la 65°C până la obținerea unei umidități de 7%. Turba uscată este în general spartă într-o moară cu ciocane. Pentru că numeroși producători de inoculant consideră esențială finețea particulelor, rezultatele bune au fost raportate cu turbă cernută cu o sită de 2 mm.

Valoarea de pH și umiditatea sunt alți parametrii importanți în alegerea excipientului. Cea mai mare parte a zăcămintelor de turbă, în afară de cele din Mont Gambier utilizate în Australia au un pH scăzut și necesită adăugarea unui agent neutralizant înainte de folosire. Suporturile de turbă sunt de obicei ajustate la un pH de 6,0-7,0 cu carbonat de calciu. Carbonatul de calciu este mai bun decât carbonații de sodiu și potasiu. O umiditate finală de 40-50% după adăugarea culturii de Rhizobium pare favorabilă pentru supraviețuirea culturii pentru cea mai mare parte a turbei utilizate ca suport. O umiditate de sub 30% sau de peste 60% este în general defavorabilă supraviețuiri.

14.1.5.2. Sterilizarea turbei

Este evident că speciile de *Rhizobium* cu creștere lentă, precum speciile specifice pentru soia sau lotus, nu pot supraviețui decât foarte greu într-o turbă nesterilă; totuși aceasta întreține supraviețuirea tulpinilor cu creștere rapidă. Chiar dacă sterilizarea nu este neapărat esențială pentru toate turbele, pentru unele este o necesitate prealabilă pentru a asigura reușita unui inoculant cu *Rhizobium*.

De obicei se folosesc vapori pentru o sterilizare care necesită între 1-4 ore la cca 120°C sau 3 ore la 120°C. Trebuie să notăm totuși că cercetătorii australieni au constatat că un tratament al turbei cu căldură excesivă poate fi în detrimentul creșterii și supraviețuiri culturilor de *Rhizobium*.

Chenn (1999) au raportat o excelentă supraviețuire a celulelor de *Rhizobium* în turbă iradiată cu raze gama. Totuși iradierea gama nu pare să sterilizeze complet turba și anumite microorganisme par să reziste bine la doze de 2,4-2,8 x 10^6 rad.

S-a încercat sterilizarea gazoasă a turbei în Africa de Sud utilizând Etox (90 % oxid de etilenă + 10% dioxid de carbon) la 500, 750, 1000 mg/l timp de 8-

16 ore (Kishinevsky, 1987). O caracteristică comună a tuturor turbelor tratate cu Etox este diminuarea sensibilă a numărului de *Rhizobium* la scurt timp după inoculare.

14.1.6. Prepararea produsului finit

Etapa următoare în producerea de inoculant pentru leguminoase este amestecul culturii lichide cu suportul solid. Inoculantul proaspăt obținut este așezat în straturi subțiri și lăsat la temperatura camerei timp de mai multe ore înainte de a fi împachetat. Astfel temperatura lui scade și permite o atașare mai bună a celulelor pe turbă.

Ambalajele în care se păstrează inoculanții sunt importante pentru că schimburile de gaze și variațiile de umiditate pot să aibă efect asupra calității inoculantului. Primele rezultate pozitive s-au obținut folosind sticle acoperite cu dopuri de vată și celofan, utilizate în Olanda. În timp ce în Australia s-au folosit saci de polietilenă cu densitate scăzută (0,038-0,051 mm), în Noua Zeelandă și Africa de Sud au fost considerați mai buni sacii cu densitate ridicată (0,31 – 0,32 mm).

Concentrația inoculantului este un subiect mult discutat. Relația dintre numărul viabil de celule plasate pe semințe și succesul nodulației nu este încă bine stabilită. În condiții favorabile de mediu (umiditate, temperatură, oxigen, compoziția chimică a solului) aplicarea unor tulpini de *Rhizobium* poate conduce la o colonizare rapidă a rădăcinii în dezvoltare și apariția a numeroși noduli. Din contră, în condiții defavorabile sau când sunt deja prezente alte bacterii *Rhizobium* în sol, este necesar un inocul concentrat pentru asigurarea succesului (peste 5000 celule/sămânță).

Se pot obține inoculanți care conțin mai multe tipuri de bacterii fixatoare de azot. Inoculanții cu tulpini multiple conțin fie tulpini provenite din două grupe de inoculare (de exemplu tulpini pentru trifoi și lucernă), fie un amestec de tulpini care fac parte din aceeași grupă. Primul tip este utilizat pentru a simplifica modul de aplicare, putând fi aplicat pe diferite culturi, dar nu este recomandat din cauza numărului redus de celule de *Rhizobium* pentru fiecare grup de leguminoase în parte. Al doilea tip este utilizat pentru a furniza un inoculant eficace pentru un spectru mai larg de plante gazdă aparținând aceleași specii și pentru a elimina variațiile nedorite datorate specificității de gazdă.

14.1.7. Testarea și aplicarea unui inoculant

S-au făcut mai multe teste pentru a controla calitatea unui inoculant:

1) teste calitative pentru detectarea imediată a unei contaminări sau a unei tulpini necorespunzătoare în cultura lichidă (pH, aglutinare, testul metabolizării glucozei);

2) teste cantitative în culturile proaspete: numărul total de germeni și numărul coloniilor de *Rhizobium*;

3) teste cantitative a produsului finit conditionat: UFC în plăci pe mediu gelozat cu manitol, extract de drojdie și roșu de Congo;

4) gradul de infectare a plantei inoculate, respectiv virulenta tulpinii de *Rhizobium*.

Există două metode principale de aplicare a inoculantului pe semințele de leguminoase: directă și indirectă. Metodele directe se referă la punerea împreună a inoculantului și a seminței înainte de semănare prin pudrare, umectare sau amestecare. Metodele indirecte se referă la aplicarea inoculantului sub formă lichidă sau de granule după ce semințele au fost semănate în sol.

A. Pudrarea

Fabricanții recomandă de obicei să nu se amestece inoculantul cu sămânța decât scurt înainte de semănare. Prin această metodă câteva celule aderă la sămânță fixându-se în asperitățile și ridurile de pe tegumente și prin atracție electrostatică. Totuși uneori celulele au tendința să se detașeze de sămânță, mai ales în procesul de semănare, când sămânța intră în contact cu angrenajele semănătorii. Din această cauză pudrarea nu se recomandă.

B. Inocularea cu soluție apoasă

Prin această metodă cultura de bacterii fixatoare de azot este aplicată sub forma unei soluții apoase sau inoculantul se amestecă cu semințele umezite. Totuși, semințele trebuie mai apoi uscate (nu la lumina directă a soarelui) și în timpul acestei uscări o parte din inoculant are tendința de a se desprinde. O cantitate mai mare de celule pot adera la sămânță folosind un adeziv în soluție, de exemplu 10% soluție zaharoză, gumă arabică sau carboximetilceluloză.

C.Învelirea seminței

Învelirea semințelor de leguminoase cu var este un mijloc de a proteja celulele de *Rhizobium* împotriva solurilor acide și a îngrășămintelor. Învelirea presupune amestecul inoculantului cu un adeziv, apoi plasarea amestecului pe sămânță. Semințele sunt apoi amestecate cu un material de învelire. Adezivii folosiți în mod obișnuit sunt sintetici sau vegetali, gelatină, diverse zaharuri. Oricare ar fi adezivul folosit, el trebuie să fie destul de puternic pentru a evita desprinderea materialului de învelire, ceea ce ar putea conduce la un blocaj al semănătorii. Materialele de învelire testate sunt carbonatul de calciu sub diverse forme, dolomită, diverse tipuri de gips, bentonită, diverse argile, superfosfat, fosfat natural și alți compuși fosfați, oxid de titan, humus, talc, carbune.

D. Preinocularea

Semințele pot fi preinoculate de către comercianți înainte de a fi vândute sau distribuite fermierilor. Aceasta implică o perioadă de conservare a seminței inoculate înainte de a fi semănată.

A fost pusă la punct o tehnică de impregnare a seminței pentru a prelungi viața inoculantului, introducând celulele de *Rhizobium* sub membrana externă acolo unde există protecție împotriva secetei sau a altor condiții de mediu adverse.

E. Metoda de inoculare indirectă cu suspensii

Tehnologia permite administrarea suspensiilor de bacterii în sol, deasupra semințelor și permite aplicarea unor cantități mai mici de inoculant.

Datele recente comparative asupra răspunsului trifoiului la inoculant sunt prezentate in tabelul nr. 7.

Alte studii, Tikhonovich (1995) a descris obținerea unui inoculant granulat cu *Rhizobium phaseoli*, utilizând un aparat de producere a drajeurilor în farmacie din sodiu-carboxilmetilceluloză și sulfat de calciu. Răspunsul la inoculare a fost mai bun decât în cazul altor metode, de exemplu învelirea seminței. Alte studii descriu obținerea unor inoculanți granule pornind de la turbă. Cu această metodă se pot aplica tratamente chimice semințelor fără teama de a distruge celulele de *Rhizobium*. Aceasta este potrivită pentru cultura de soia în soluri calde și nisipoase.

Tabelul 14.7

Răspunsul trifoiului la două tipuri de inoculanți

Metoda de inoculare	Timp de conservare	Celule de *Rhizobium* / sămânță trifoi		Număr de plante	Greutate de frunze mg/ plantă	% plante cu noduli
		adăugat	Prezente pe sămânță			
Nici una		0	0	104	13,2	0
Cultură proaspătă în mediu lichid cu 0,1% Ca_3PO_4	Preparare proaspătă	2000	300	87	14,7	79
1 g de inoculant granule / 10 g semințe	7 săptămâni	1600	30	78	17,2	92

14.1.8. Factorii care afectează răspunsul la inoculare

Pe scurt, efectele benefice ale inoculării pot fi rezumate după cum urmează:

1. este preântâmpinată lipsa azotului în culturile tinere;
2. consumul de azot din sol a leguminoaselor este redus;
3. randamentul recoltei este crescut;
4. calitatea recoltei este îmbunătățită;
5. cultura deleguminoase poate fi un excelent îngrășământ verde, bogat, care se descompune rapid și are efect de ameliorare a solului.

Mulți factori pot conlucra la succesul inoculării și de aici la fixarea azotului. Cantitatea de azot fixat prin *sistemul simbiotic Rhizobium- leguminoasă* este influențată de numeroși factori chimici și fizici din mediu care pot afecta planta gazdă, bacteria *Rhizobium*, dezvoltarea și funcționarea eficace a nodulilor.

a). Atmosfera din sol

Compoziția gazelor din sol poate varia considerabil față de compoziția atmosferei. În sol există de obicei mai mult dioxid de carbon și mai puțin oxigen din cauza respirației microorganismelor și a rădăcinilor plantelor.

b). Azotul atmosferic

În general concentrația de azot liber din sol este suficientă pentru a permite o fixare nelimitată a azotului. În condiții de sol mlăștinos concentrația de azot va fi mai scăzută și în același timp nivelul de oxigen va fi prea scăzut pentru a permite o creștere optimă a plantei.

c). Oxigenul

Pentru formarea și funcționarea nodulilor, este necesar un aport abundent de oxigen. În sol, de obicei nivelul de oxigen este de sub 20%, concentrație la care formarea și funcționarea nodulilor nu vor fi optime. În plus, când există apă în exces se poate produce o diminuare temporară a activității de fixare a azotului deoarece apa care înconjoară nodulii va cauza o reducere a aportului de oxigen.

d). Dioxidul de carbon

S-a demonstrat că o creștere a dioxidului de carbon din atmosferă ar stimula fixarea azotului la trifoii nodulați, iar acest fapt s-ar datora creșterii activității fotosintetizante. Au fost raportate efecte benefice asupra nodulației și fixării azotului la culturi aerate a rădăcinilor leguminoaselor cu aer conținând 4% dioxid de carbon (Kloepper, 1992). El a arătat că adăugarea de dioxid de carbon în culturile de soia crește fixarea azotului de cinci ori dublând activitatea specifică de nodulare și se dublează masa medie a nodozităților.

e). Valoarea de pH a solului

S-a semnalat o mare variabilitate în ceea ce privește toleranța la pH printre speciile de *Rhizobium*. Chenn (1999) a trecut în revistă efectul pH-ului asupra culturilor de *Rhizobium* și a tras concluzia că *Rhizobium meliloti* este sensibil la aciditate, *Rhizobium trifolii* este mai puțin sensibil, iar *Rhizobium japonicum* este tolerant la aciditate. Vintilă T. (2005) a izolat tulpini de *Rhizobium meliloti* care se dezvoltă optim la valori de pH 6 – 7, bine la valori de 5 sau 8 și satisfăcător la valori de 4 sau 9. El a arătat că valoare de pH acidă (4) este mai greu tolerabilă decât valoarea de pH bazică, la care tulpinile testate se dezvoltă destul de bine (chiar și la pH 9). Totuși, aceste tulpini pot fi folosite cu succes la inocularea culturilor de leguminoase pe soluri acide sau alcaline, având în vedere că pe solurile cultivate cu leguminoase nu se vor atinge astfel de valori extreme de pH.

f). Temperatura

Temperatura este unul dintre factorii importanți care influențează supraviețuirea bacteriei *Rhizobium* în sol. Tulpinile de *Rhizobium meliloti* sunt

relativ tolerante la temperaturi ridicate şi sa raportat că limitele se situează între 36,5- 42,5°C. *Rhizobium meliloti* în amestec cu turbă a supraviețuit 21 de zile la 40°C în condiții de laborator şi timp mai îndelungat la temperaturi înalte cu intermitență în condiții de teren. Chowdhury a arătat că temperaturi mai mari de 35-40°C sunt fatale pentru speciile de *Rhizobium trifolii* şi *Rhizobium lupini* atunci când sunt introduse într-un sol steril şi infertil. Salem şi Szegi au arătat că creşterea optimă a unor tulpini de *R. phaseoli* s-a obținut la 30°C, iar o incubare la 40°C au limitat creşterea în trei tipuri de sol.

g). Umiditatea

În mod identic cu toate bacteriile din sol, bacteriile din genul *Rhizobium* se dezvoltă bine atunci când se află în prezența de apei, în care substanțele dizolvate să nu fie atât de concentrate încât să ridice probleme osmotice pentru celulă. Prea puțină apă reprezintă o amenințare pentru supraviețuire şi funcționare.

Chen şi colab. (1995) a examinat supraviețuirea unor culturi de *Rhizobium* în condiții de secetă pe trei soluri cu culturi de leguminoase inoculate cu *Rhizobium*. *Rhizobium trifolii* s-a dovedit a fi mai tolerant la secetă decât *Rhizobium meliloti* şi decât *Rhizobium leguminosarum*.

h). Salinitatea

Numeroase rapoarte arată că creşterea şi dezvoltarea culturilor de *Rhizobium* şi fixarea azotului la diverse leguminoase se reduc pe măsură ce nivelul de salinitate creşte.

Loret (1995) a arătat că rata de mortalitate la *R. trifolii* creşte cu mărirea concentrației de sare în turbă. O creştere a concentrației de sare în apa de irigație conduce la o scădere importantă a greutății în cazul plantei de soia şi o reducere a nodulilor (Miller, 1996).

Vintilă T. (2005) a izolat tulpini de *Rhizobium trifolii* rezistente la salinitate, care pot fi folosite la inocularea culturilor de leguminoase pe solurile în care salinitatea a crescut datorită irigării abundente cu apă din pânza freatică. Bacteria se dezvoltă foarte bine în condiții medii de salinitate, şi chiar se obține o accelerare a diviziunii celulare prin adăugarea a 0,1 M NaCl în mediul de cultură.

i). Lipsa de apă şi lumină

Cercetările arată că lipsa de apă afectează apariția de nodozități şi creşterea nodulilor tineri, (Tabelul 14.8.) însă nu este clar dacă reducerea numărului de noduli este rezultatul numărului mic de bacterii *Rhizobium* disponibile pentru infectare, sau este datorat unui proces de încetinire a infecției, sau din ambele cauze. Cele mai multe bacterii de acest fel sunt foarte sensibile la deficitul de apă din sol, ceea ce afectează negativ capacitatea fixării azotului şi din această cauză şi productivitatea tuturor leguminoaselor (Miller, 1996).

Umbra copacilor este un factor major care afectează nodulația şi fixarea azotului la anumite plante. Umbra reduce în principal numărul şi mărimea nodozităților, însă doar o umbră foarte deasă pare să afecteze activitatea nodulară pe greutate unitară de țesut la *Phaseoli vulgaris*.

Tabelul 14. 8

Efectul lipsei de apă asupra numărului, mărimii nodulilor şi activitatea de reducere a acetilenei la plantele de *P. vulgaris* (44 zile) inoculate cu două tulpini de *Rhizobium phaseoli* (Miller, 1996).

	Tulpini de *Rhizobium*			
	3601		3605	
	Martor	Lipsă de apă	Martor	Lipsă de apă
Pmoli C_2H_2 /mg	16,45	1,75	37,45	3,15
Număr de noduli	28,40	8,3	18,50	4,5
Greutatea medie a nodulilor (mg)	1,44	0,95	1,72	1,16
Conţinut în apă al nisipului (%)	6,54	0,71	6,34	0,81

j). Materiale de drajare a seminţelor

S-a demonstrat că substanţele toxice, solubile în apă cu care se drajează seminţele, inhibă creşterea pentru *Rhizobium*. Seminţele mai multor leguminoase drajate cu substanţe toxice au dat nivele considerabile de toxicitate pentru diverselor tipuri de *Rhizobium*.

k). Azotul combinat

S-a raportat că anumite forme de azot combinat fac să reducă nodulaţia leguminoaselor şi fixarea azotului. Gradul de inhibiţie depinde de numeroşi factori, inclusiv concentraţia şi forma azotului, momentul aplicării şi tulpinile utilizate.

Brockwell (1980), a observat că adăugarea de uree în cultura de soia permite o dezvoltare şi o funcţionare eficace a nodozităţilor. Aceasta sugerează că dacă această formă de azot ar putea fi stabilizată, adică dacă hidroliza ureei şi nitrificarea consecutivă ar putea fi împiedicate, soia ar putea simultan să fixeze azotul şi să absoarbă azotul combinat.

l). Oligoelemente

S-a demonstrat că deficienţa în oligoelemente afectează creşterea leguminoaselor. Chiar dacă majoritatea acestor deficienţe nu inhibă fixarea azotului, ele limitează creşterea plantei gazdă. S-a demonstrat că un rol important îl au molibdenul, cobaltul şi borul.

m). Pesticidele

Toate fungicidele sunt susceptibile de a fi toxice într-o anumită concentraţie pentru *Rhizobium*. Astfel, când gazda trebuie în acelaşi timp tratată împotriva unei infecţii fungice şi inoculată cu *Rhizobium*, trebuie să se realizeze un echilibru între cele două efecte selecţionând fungicidele cu precauţie. Componentele care conţin metale toxice precum mercur, cupru, zinc constituie întotdeauna un risc serios. De asemenea, efect inhibitor sau letal pot să-l producă şi compuşii aromatici halogenaţi, chiar dacă gradul de risc diferă în funcţie de formula chimică şi de raportul în compoziţia totală a produsului fungicid.

În ceea ce priveşte efectul insecticidelor asupra bacteriilor de Rhizobium, studiile de laborator sunt foarte puţine, dar există indicaţii clare în ceea ce priveşte efectul lor toxic asupra seminţelor inoculate.

Unele erbicidele par să nu aibă efect asupra culturilor de *Rhizobium*, în timp ce altele sunt dăunătoare. Informațiile privind nivelul de inhibiție sunt confuze, datorită faptului că speciile și tulpinile în interiorul speciilor diferă considerabil în ceea ce privește sensibilitatea, chiar și față de un singur erbicid și datorită faptului că rezultatele sunt susceptibile să fie afectate de condițiile locale și perioada de inoculare.

n). Competiția

Un atribut important al unei tulpini de *Rhizobium* este capacitatea sa de a intra în competiție în formarea nodulilor cu alte specii de *Rhizobium* prezente în sol. Este esențială capacitatea de a coloniza rizosfera în număr mare și de a intra în competiție cu speciile preexistente.

Un exemplu de rezultate în ceea ce privește studiul acestui factor este analiza competiției dintre tulpinile de *Rhizobium japonicum 110, 38, 76* introduse într-un sol fără alte specii de *Rhizobium*. Tulpina 110 a produs 98% noduli când a fost utilizată cu tulpina 38 și 76% când a fost combinată cu tulpina 76. Tulpina 76 a produs 95% noduli când a fost combinată cu tulpina 38 (Tikhonovich și colab, 1995).

o). Factori biotici

Au fost avansate multe ipoteze pentru a identifica eșecul în colonizarea bacteriei *Rhizobium* sau declinul populațiilor prezente natural sau al celor adăugate deliberat în sol. Colonizarea poate fi periclitată de microorganismele producătoare de toxine, protozoare și nematode.

Actinomicetele introduse în sol steril împreună cu R. japonicum în momentul însămânțării leguminoasei au redus numărul de noduli cu 53%.

Extractele din anumite soluri în care eșuase nodulația trifoiului erau frecvent toxice pentru *Rhizobium trifolii* și s-a presupus că ciupercile producătoare de antibiotice care se dezvoltă pe materia organică ar putea conduce la eșecul nodulației (Bergersen, 1978).

S-a sugerat că bacteriofagii joacă un rol important în diminuarea fixării azotului. Totuși, nu este clar dacă bacteria *Rhizobium* este în vreun fel afectată de către bacteriofagii din sol.

S-a demonstrat că unele specii de fungi, cum este ciuperca *Rhizoctonia* provoacă o diminuare cu 63% a azotului fixat de plantele de soia inoculate (Kloepper, 1992). În schimb, alte ciuperci, cum este *Glomus intraradices* stimulează metabolismul și diviziunea celulară a bacteriilor din genul *Rhizobium*, (Selegean M., Dragomir N, 2003).

Bdellovibrio este un habitant al solului care se găsește în natură ca un parazit obligatoriu. Speciile care parazitează *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium trifolii* au fost găsite în numeroase celule gazdă și s-ar putea să fie responsabile de moartea bacteriei *Rhizobium* în sol (Alexander, 1975).

Se presupune că protozoarele din în sol consumă *Rhizobium*. Unii cercetători au observat că numărul celulelor de *Rhizobium japonicum* introduse într-un sol descrește datorită protozoarelor.

Cu toate că un protozoar poate să consume mii de bacterii, după 12 zile rămân totuși 6,3 x 10^7 *Rhizobium* / g. În plus, s-a arătat că ciliatul *Tetrahymena* elimină *Rhizobium japonicum* dacă multiplicarea acestuia este inhibată cu

cloramfenicol. În schimb, atunci când *Tetrahymena* s-a hrănit cu *Rhyzobium* în absența inhibitorului, numărul celulelor de *Rhyzobium* nu a scăzut sub 10^6/ml.

S-a constatat că nematodele interferează în asocierea *Rhizobium* - leguminoase. O proporție mare de noduli arătau o penetrare larvară doar în condițiile în care predominau nematodele (Bergersen, 1978). Plantele de soia infectate cu *Heterodera glicines* au prezenta o proporție a nodulilor și o fixare de azot reduse în timp ce plantele infectate cu alte specii de nematode nu au arătat aceste simptome când au fost introduse nematode închistate 14 zile după inocularea cu *Rhizobium*.

Sunt cunoscute două insecte care atacă nodozitățile leguminoaselor: *Sitona lineata și Rivellia sp.* Larvele de *Sitona* ajung la maturitate în interiorul nodulilor anumitor leguminoase precum *Vicia faba* (mazăre) și uneori lupinul în Europa. Larvele de *Rivellia* atacă nodulii de *Glycine javanica* (o varietate de soia) distrugând astfel 50-70% din nodozități.

14.1.9. Cantitatea de azot fixat de diferite leguminoase

Există multe cercetări care analizează cantitatea de azot fixat de leguminoase. În general, leguminoasele folosite în alimentație fixează mai puțin azot decât leguminoasele furajere, totuși acest lucru depinde de cultura însăși și de factorii care intervin în creșterea și dezvoltarea plantelor și a bacteriilor fixatoare de azot.

Randamentul culturii cerealiere care urmează depinde mult de cantitatea de azot pe care leguminoasele o adună în sol. Cantitatea de azot fixat variază între **79-505 kg / ha**. Leguminoasele cultivate pentru boabe (mazăre, fasole, soia, arahide) tind să reducă cantitatea de azot din sol, în timp ce leguminoasele cultivate pentru frunze (trifoi, lucernă) cresc conținutul de azot. Tikhonovich (1995) a arătat că conținutul de azot din sol variază în funcție de cultură. Conținutul de azot din sol variază între **34-259 kg / ha** în culturile de leguminoase, iar în culturile de neleguminoase ca orzul, susanul, cicoarea, conținutul de azot variază între **7-38 kg / ha**.

Fără a fi aplicate îngrășăminte cu azot, după o cultură de soia inoculată randamentul grâului a fost superior cu 65% față de cel obținut după o cultură de soia neinoculată. Răspunsul echivalează cu cca. 30 kg azot / ha.

14.2. AGRICULTURA BIOLOGICĂ – UN VIITOR SĂNĂTOS

14.2.1. Scurt istoric

Într-o vreme în care omul a devenit conștient că trăiește într-o lume din ce în ce mai secătuită și cu viitorul periclitat prin activitățile sale, trebuie folosită orice posibilitate pentru menținerea bazei vieții acestuia pe Pământ.

Degradarea mediului este o problemă apărută şi accentuată ca urmare a creşterii demografice şi suprapopulării unor zone din ce în ce mai mari ale globului şi datorită faptului că oamenii au considerat natura ca sursă inepuizabilă de materii prime şi energie, dar şi ca receptor nelimitat al deşeurilor.

Pentru a-şi satisface nevoile de trai omul a început prin a vâna, apoi a crescut animale, a cultivat pământul, a extras minereuri şi le-a prelucrat. În paralel cu progresele tehnice şi cu modificările antropice cu rol pozitiv (împăduriri, îndiguiri, desecări) au avut loc şi fenomene negative: s-a degradat solul unor regiuni întinse, au dispărut unele specii de animale şi de plante spontane, s-au epuizat unele zăcăminte minerale, s-au tăiat păduri, etc.

Producţia de bunuri de consum a determinat apariţia de deşeuri, rezultate din procesele tehnologice, iar diversificarea activităţilor umane a condus la poluarea mediului înconjurător.

Poluarea este fenomenul de apariţie şi de producere a unor dezechilibre ecologice cu efecte negative, atât asupra naturii, cât şi asupra oamenilor. Poluant este acel factor care generează disconfort sau are acţiune toxică asupra organismelor, degradează componentele mediului, provoacă unele dezechilibre ecologice. Orice factor util care depăşeşte optimul devine toxic sau chiar letal, deci devine poluant.

Agricultura care se bazează pe chimizare poate deveni sursă de poluare a aerului, a solului şi apei freatice. Dacă în cazul apei şi aerului poluarea înseamnă pătrunderea unor substanţe care au efect nociv asupra omului şi animalelor dar a căror efect poate fi înlăturat dacă se elimină cauza, în cazul poluării solului lucrurile sunt mai grave, deoarece acesta s-a format într-o perioadă îndelungată iar distrugerea echilibrului său poate avea repercusiuni mari în timp. Poluarea solului duce la afectarea fertilităţii sale, dereglându-se toate funcţiile fizico–chimice, biologice şi biochimice ale acestuia.

Agricultura poate deveni sursă de poluare prin:

- ✓ îngrăşămintele şi produsele fitosanitare, precum pesticidele, utilizate foarte mult în practicile de producţie intensivă;
- ✓ folosirea erbicidelor, a căror utilizare afectează biodiversitatea mediului;
- ✓ declanşarea şi favorizarea proceselor de degradare a solului (eroziune, sărăturare, compactare);
- ✓ lucrări neadecvate de îmbunătăţiri funciare;
- ✓ dejecţiile de la fermele de creştere a animalelor.

Agricultura poate provoaca serioase daune mediului înconjurător, fiind cel mai mare consumator de apă, precum şi cea mai mare sursă de poluare cu nitraţi a apelor subterane şi a apelor de suprafaţă. Ea este, de asemenea, principala sursă de poluare cu azot amoniacal, cu fosfaţi şi responsabilă de eliberarea în atmosferă a

unor gaze nocive, care determină efectul de seră (metan, oxid nitros), fiind aşadar necesară luarea unor măsuri care să contracareze aceste efecte negative.

În anul 1970, se vehiculează pentru prima dată ideea că resursele planetei sunt limitate şi că este necesară practicarea unei agriculturi alternative, care să menţină potenţialul productiv al solului şi să ducă la stoparea degradării acestuia. În acest context apar concepţii, idei şi mişcări care încearcă să ofere soluţii alternative pentru refacerea şi conservarea ecosistemelor agricole.

Sistemele de agricultură practicate astăzi îmbracă mai multe forme dintre care unele pot duce la soluţionarea uneia dintre dilemele care marchează lumea contemporană: poluare sau scăderea eficienţei economice?

Agricultura convenţională, practicată în multe ţări ale lumii, este un sector intensiv mecanizat, care se bazează pe concentrarea şi specializarea producţiei. Prin acest sistem de agricultură se obţin produse competitive, dar prezintă dezavantajul utilizării fertilizărilor minerale cu doze mari şi foarte mari de îngrăşăminte, a monoculturii sau rotaţiilor de doi-trei ani, precum şi folosirea pe scară largă a substanţelor chimice pentru combaterea buruienilor, bolilor şi dăunătorilor. De asemenea, se pune un accent deosebit pe lucrarea intensivă a solului, bazată pe arături cu întoarcerea brazdei şi numeroase alte lucrări pentru pregătirea patului germinativ.

În acest sistem de cultură nu se iau în consideraţie elementele specifice de climă, sol, relief, condiţiile sociale şi economice, care determină nivelul de vulnerabilitate faţă de diferitele procese de degradare chimică, biologică, fizică a solului şi a mediului.

Agricultura de subzistenţă, cu o producţie slab competitivă, bazată pe utilizarea în cantităţi mici a îngrăşămintelor chimice, pesticidelor, erbicidelor şi a altor substanţe de sinteză. Se utilizează soiuri sau populaţii locale pentru cultura plantelor, în timp ce hibrizii şi soiurile performante sunt prezente în număr mic (în legumicultură). Acest sistem de cultură se practică la noi în ţară de către producătorii individuali şi afectează mediul înconjurător prin dezechilibre de nutriţie şi prin substanţele chimice de sinteză utilizate neraţional.

Agricultura biodinamică a fost prima mişcare organizată, definită şi elaborată de cultivatori şi filozofi, bazată pe respectarea legilor naturale ale vieţii. Promotorul acestei idei a fost Rudolf Steiner, care a pus bazele "antropozofiei" conform căreia noile sisteme de cultură agricolă vor fi realizate în strânsă corelare cu natura. Pentru aceasta se vor avea în vedere stimularea şi reglarea proceselor complexe ale vieţii prin preparate biodinamice pentru sol, plantă şi compost.

Preparatele biodinamice sunt realizate din plante medicinale (coada şoricelului (*Achillea millefolium*), muşeţel (*Chamomilla oficinalis*), coajă de stejar (*Quercus robur*), păpădie (*Taraxacum officinalis*), odolean (*Valeriana officinalis*) urzică (*Urtica dioica*), tufănele (*Chrisanthemum sp.*), care servesc drept adaosuri la compostare şi se folosesc cu scopul de a influenţa în mod pozitiv acest proces.

Alte preparate se folosesc pentru stropirea plantelor în câmp (gunoiul de corn şi silicea de corn, care stimulează creşterea acestora prin influenţele pozitive pe care le au asupra solului, restabilind echilibrul în natură, dereglat de intervenţia omului. Preparatele dinamizează şi echilibrează procesele biologice prin calitatea lor de a acumula energie şi informaţie telurică şi cosmică pe care le redistribuie apoi în cadrul ecosistemului.

Agricultura biodinamică se bazează, de asemenea, pe ideea influenţei specifice exercitată de conjuncturile planetare geocentrice asupra activităţii şi a vieţii organismelor. Pe această bază, se încearcă folosirea interacţiunilor existente între sol – plantă – animale – om – mediul geocosmic. Pentru semănat, plantat, lucrări de îngrijire şi recoltat se va ţine seama de influenţele cosmice exercitate, în primul rând, de poziţia lunii, dar şi a altor planete care influenţează creşterea şi dezvoltarea plantelor, fiind foarte utilă în acest scop întocmirea unui calendar cu zilele în care se pot executa lucrările respective.

Agricultura durabilă se practică în raporturi armonioase cu mediul înconjurător. În acest sistem de cultură lucrările solului, rotaţia culturilor, fertilizare, irigare, combaterea bolilor şi dăunătorilor se fac pe baze ştiinţifice, utilizând toate componentele de tehnologie modernă. Se folosesc îngrăşămintele chimice şi unele produse de sinteză, dar în cantităţi foarte bine controlate şi aplicate în aşa fel încât să se reducă, pe de o parte cheltuielile cu aplicarea lor, însă, pe de altă parte, acestea să fie foarte eficiente şi să nu polueze solul şi mediul înconjurător.

Obţinerea unor producţii ridicate se realizează prin lucrări mecanice executate la timp şi pe cât posibil cu puţine treceri pe teren, iar fertilizarea culturilor se va face cu îngrăşăminte organice rezultate din creşterea animalelor în fermele proprii, îngrăşămintele chimice venind în completare doar atunci când este absolută nevoie. De asemenea, se practică stocarea, prelucrarea şi utilizarea reziduurilor rezultate din activităţile agricole.

Agricultura organică se bazează pe ideea folosirii în exclusivitate a îngrăşămintelor organice în doze relativ ridicate, aplicate în scopul fertilizării culturilor şi refacerii pe termen lung a stării structurale a solurilor, degradată prin activităţi antropice intensive şi/sau datorită unor procese naturale.

Fondatorul ideii, Albert Howard şi-a enunţat teoriile în "Testamentul agricol" publicat în 1940, în care se subliniază rolul îngrăşămintelor organice şi a celor verzi şi se menţionează dezavantajele monoculturii şi folosirii îngrăşămintelor chimice.

Totodată, în cadrul agriculturii organice se utilizează rotaţia culturilor, mulcirea solului pentru ameliorarea microstructurii şi se încurajează dezvoltarea microorganismelor, asocierea plantelor, culturile succesive pentru o acoperire continuă a solului (care în acest fel va fi protejat de influenţa erozivă a ploii, vîntului şi soarelui), şi terasarea (pentru conservarea apei din sol şi pentru evitarea

degradării prin eroziune). Dacă este bine organizat, acest tip de agricultură poate duce la reducerea sau chiar eliminarea poluării şi contribuie la conservarea apei şi a solurilor pe teritoriul fermei. Totuşi, uneori, datorită cantităţilor mari de îngrăşăminte organice aplicate se poate ajunge şi la poluarea apelor freatice.

Agricultura organo-biologică este promovată de Hans Peter Rusch şi H. Muller, care propun utilizarea resurselor refolosibile, deşeurilor de la populaţie, resturilor vegetale care rezultă de la culturile agricole şi folosirea unor metode cât mai apropiate de natural care să ducă la supravieţuirea cât mai multor fiinţe vii în sol.

Agricultura biologică (ecologică) este conform definiţiei acceptate în Uniunea Europeană, acel sistem de cultură care tinde să valorifice şi să păstreze sistemele biologice productive fară a recurge la substanţe chimice de sinteză, ce valorifică şi păstrează metodele de cultură biologice, productive în cadrul ecosistemului, vizează obţinerea unor produse de o calitate nutritivă ridicată, ameliorează fertilitatea solului pe termen lung şi elimină toate formele de poluare.

Prin eliminarea sau reducerea produşilor chimici din ferme, agricultura biologică poate contribui eficient la menţinerea unui mediu ambiant curat, favorizând dezvoltarea vegetaţiei naturale şi a lumii animale. Cu cât numărul gospodăriilor agricole biologice va fi mai mare, cu atât efectul ecologic devine mai benefic. Dar şi din punct de vederea economic efectele sunt favorabile, deoarece produsele care se obţin au calităţi biologice superioare, au o valoare nutritivă crescută, îşi menţin calitatea timp îndelungat, ameliorează starea de sănatate a consumatorilor şi pot fi valorificate la preţuri mai mari comparativ cu produsele obţinute în agricultura convenţională.

După Claude Aubert, agricultura biologică este *"agricultura bazată pe observarea legilor vieţii care constau în a nu hrani direct plantele cu îngrăşăminte solubile ci fiinţele vii din sol care elaborează şi furnizează toate elementele de care plantele au nevoie."*

Agricultura biologică este mai puţin agresivă în raport cu factorii de mediu, fiind bazată pe sisteme de cultură în care se aplică tehnologii care se armonizează cu mediul şi unde se reduce sau se renunţă la utilizarea pesticidele, îngrăşămintele şi a altor compuşi chimici tehnologici de sinteză, cu obţinerea unor produse agricole mai puţin competitive din punct de vedere economic pe termen scurt, dar superioare din punct de vedere calitativ.

Pentru controlul calităţii acestor produse este necesară certificarea tehnologiilor utilizate.

În agricultura biologică se pune accent deosebit pe calitatea produselor care se comercializează şi se urmăreşte ca acestea să satisfacă cerinţele consumatorilor.

Conceptul de calitate se referă la mai multe tipuri caracteristice:

✓ Calitatea organoleptică, determinată de aspectul produsului, formă, mărime, culoare, aromă, gust;

✓ Calitatea igienică a produsului, dată de absența microorganismelor patogene sau a unor reziduuri toxice (pesticide, metale grele, nitrați);

✓ Calitatea tehnologică, reprezentată de capacitatea de păstrare a unui produs, rezistența la transport;

✓ Valoarea biologică, dată de conținutul în substanțe nutritive, vitamine, proteine, zaharuri, săruri minerale, etc.

Agricultura biologică nu își propune ca obiectiv prioritar obținerea de producții mari la unitatea de suprafață, ci vizează mai curând obținerea de produse care să prezinte un conținut în reziduuri de pesticide nul sau cu mult inferior normelor admise pentru produsele agriculturii convenționale, absența microorganismelor patogene, un conținut în nitrați mai scăzut, conținut în elemente nutritive (materie uscată, zaharuri, vitamine, săruri minerale) mai ridicat decât în produsele agriculturii convenționale; calități organoleptice (gust, culoare, savoare, aromă) superioare; o mai bună digestibilitate a produselor.

Acolo unde există un interes real pentru problemele ecologice, agricultura biologică permite obținerea de progrese rapide, iar neajunsurile provocate de poluarea îndelungată vor fi înlăturate într-un timp relativ scurt.

14.2.2 Situația actuală a agriculturii biologice

Agricultura biologică este practicată astăzi în țările dezvoltate ca rezultat al înțelegerii necesității acestui gen de activitate, dar și datorită apariției unei industrii dezvoltate, care este în măsură să pună la dispoziția celor interesați unelte adecvate, îngrășăminte, preparate fitofarmaceutice naturale pentru combaterea bolilor și dăunătorilor. Totodată, prin cererea mai mare de mână de lucru agricultura biologică contribuie la crearea de noi locuri de muncă, ceea ce pentru condițiile societății actuale reprezintă un deziderat major.

Potrivit unui sondaj SOEL, realizat în luna februarie 2004, suprafața ocupată de agricultura ecologică în întreaga lume este 24 de milioane hectare. Australia deține cele mai mari suprafețe cultivate în regim ecologic (10,5 milioane de hectare), Asia are 880.000 ha, Africa 320.000 ha, America Latină 5,8 milioane hectare iar America de Nord 1,5 milioane hectare.

În Europa, suprafața cultivată în sistem ecologic este de 5,5 milioane hectare, pe primul loc situându-se Austria cu 11,30 %, urmată de Italia 7,94 %, Danemarca 6,51 %, Suedia 6,3 %, Republica Cehă 5,06 %, Franța 1,40 %. Suprafețe mici (sub 1 %) sunt cultivate în Irlanda, Slovenia, Grecia, Polonia, Slovenia (tabelul 14.1). Se estimează că în Uniunea Europeană suprafața destinată agriculturii ecologice ar putea crește anual cu aproape 1 milion de ha.

Tabelul 14.1

Suprafețe și exploatații biologice în Europa

Țara	Suprafața (ha)	Suprafața %	Număr de ferme biologice
Italia	1.230.000	7,94	56.440
Marea Britanie	679.631	3,96	3.981
Germania	632.165	3,70	14.703
Spania	485.079	1,66	15.608
Franța	419.750	1,40	10.364
Austria	285.500	11,3	18.292
Suedia	193.611	6,30	3.589
Danemarca	174.600	6,51	3.525
Finlanda	147.943	6,60	4.983
Portugalia	70.857	1,80	917
Olanda	38.000	1,94	1.528
Grecia	31.118	0,60	6.680
Irlanda	30.070	0,68	997
Belgia	22.410	0,61	694
Luxemburg	2.141	1,71	48
Cehia	218.114	5,09	654
Ungaria	105.000	1,80	1040
Slovacia	58.706	2,40	82
Polonia	44.886	0,30	1787

Sursa: SOEL – SURVEY, 2004

În ceea ce privește piața de desfacere a produselor organice se constată că pe plan mondial supremația o deține USA (tabelul 14.2).

Tabelul 14.2

Vânzări ale produselor ecologice în anul 2003

Tara	Vânzări (milioane euro)	Ponderea din totalul vânzărilor (%)
USA	11000 – 13000	2,0-2,5
Canada	850-1000	1,5-2,0
Japonia	350-450	0,5
Oceania	75-100	0,5
Germania	2800-3100	1,7-2,2
Marea Britanie	1550-1750	1,5-2,0
Italia	1250-1400	1,0-1,5

Franța	1200-1300	1,0-1,5
Elveția	725-775	3,2-3,7
Olanda	425-475	1,0-1,5
Suedia	350-400	1,5-2,0
Danemarca	325-375	2,2-2,7
Austria	325-375	2,0-2,5
Belgia	200-250	1,0-1,5
Irlanda	40-50	0,5

Sursa: SOEL – SURVEY, 2004

În Europa, Germania realizează cele mai multe vânzări, iar cel mai mare consum de produse organice pe cap de locuitor îl deţin Danemarca şi Elveţia. Cota realizată de produsele agroalimentare obţinute prin tehnologii ecologice pe piaţa produselor agroalimentare din UE este de aproximativ 1,5%, din totalul produselor care se comercializează, dar se prevede o creştere considerabilă a acestui segment de piaţă mai ales în Germania, Austria şi Danemarca.

În ţara noastră primele exploataţii în care se practică agricultura biologică au apărut după anul 1989.

România deţine un potenţial de producţie ecologică ridicat datorită faptului că agricultura tradiţională românească se bazează pe tehnologii nu foarte poluante, există posibilitatea de a se delimita perimetrele ecologice, nepoluate unde să se aplice principiile agriculturii ecologice, cererea pentru produse ecologice este în creştere, ceea ce constituie un avantaj în trecerea la agricultura ecologică.

Alt avantaj important îl constituie dorinţa multor producători, îndeosebi a celor care deţin exploataţii mici, de a practica agricultura ecologică, aceştia se vor adapta uşor la principiile şi regulile noului sistem de cultură, în felul acesta se vor oferi şi locuri de muncă populaţiei de la sate.

Pentru a se putea realiza o agricultură biologică corespunzătoare e necesar ca fermele să fie organizate ca gospodării mixte în care să se producă furajele necesare hrănirii animalelor, care vor furniza la rândul lor îngrăşământul organic ce va fi folosit la fertilizarea celorlalte culturi agricole.

De asemenea, este necesară elaborarea unui plan de măsuri care să vizeze creşterea numărului de producători din agricultura ecologică; dezvoltarea capacităţilor de producţie; asocierea micilor producători în forme de cooperare în vederea comercializării produselor ecologice; creşterea numarului de ONG-uri implicate în programele de dezvoltare a comerţului cu acest tip de produse agroalimentare; facilităţi pentru exportul produselor ecologice şi introducerea lor în agroturism.

Din analiza datelor statistice prezentate de organismele de inspecţie şi certificare se constată că suprafaţa cultivată în agricultura biologică a crescut de la 17.438 ha (în anul 2000) la 73.800 ha (în anul 2004). Cea mai mare pondere din

această suprafață o dețin pășunile și pajiștile (cu 27.000 ha), tendințe de creștere înregistrându-se la culturile de cereale (27,9 % în 2004) precum și la plantele oleaginoase și proteice (27,2 % în anul 2004). Un progres important se înregistrează și la numărul animalelor crescute în sistem ecologic (tabelul 14.3).

Tabelul 14.3

Evoluția suprafețelor și efectivelor de animale în agricultura ecologică

Specificația	U.M	Anul				
		2000	2001	2002	2003	2004
1. Suprafața totală din care:	ha	17.438	28.800	43.850	57.200	73.800
Cereale	ha	4.000	8.000	12.000	16.000	20.500
Culturi furajere și pășuni	ha	9.300	14.000	20.000	24.000	31.300
Oleaginoase și proteice	ha	4.000	6.300	10.000	15.600	20.100
Legume	ha	38	100	700	200	300
Fructe (vișine,cireșe)	ha	-	-	50	100	200
Fructe de pădure (zmeură, afine, nuci,)	ha	50	100	300	400	500
Alte culturi	ha	50	300	800	900	900
2. Animale din care:	ha					
Vaci lapte	capete	2100	5300	6500	7200	7200
Oi lapte	capete	1700	3700	3.000	3.200	3.200
Găini	capete	-	-	-	2000	2700

Sursa: Comunicări organisme de inspecție și certificare

O creștere însemnată se înregistrează în evoluția producțiilor la principalele culturi practicate în sistem biologic.

Astfel, cantitatea de cereale a crescut de la 7.200 t în anul 2000 la 41.000 t în anul 2004. Producția la legumele ecologice a crescut de la 600 t, în anul 2000, la 4.000 în anul 2001 și 2002, înregistrând o scădere în anul 2003 și 2004 cu 2.000 și respectiv 3.000 t. Produsele oleaginoase și proteice înregistrează o creștere de la 5.500 t în anul 2000, la 37.000 t în anul 2004. Cantitatea de produse vegetale totale înregistrează o creștere spectaculoasă de la 13.502 t în anul 2000, la 87.200 t în anul 2004 (tabelul 14.4).

Tabelul 14.4.

Evoluția producțiilor obținute în agricultura biologică

SPECIFICAȚII	U.M	Anul 2000	2001	2002	2003	2004
1.Cantitate totală vegetală din care:	t	13.502	24.400	32.300	30.400	87.200
Cereale din care:	t	7.200	12.500	16.000	14.400	41.000
-export	t	-	-	-	-	7.100
Oleaginoase şi proteice din care:	t	5.500	7.200	11.000	12.480	37.000
-*export						9.800
Legume	t	600	4.000	4.000	2000	3.000
Fructe (vişine,cireşe)	t	-	-	200	300	500
Fructe de pădure (zmeură, afine, nuci, catină) din care:	t	200	400	300	320	4.500
-*export	t	-	-	-	-	3800
Alte culturi	t	2	300	800	900	1200
2.Producția animală din care:						
Lapte de vacă	hl	58367	63885	92747	92485	92868
Lapte oaie	hl	701	1740	1360	1470	1800
Ouă	mii.buc				500	650
3.Produse procesate						
Telemea oaie din care:	t	18	46	36	45	48
-*export					38	48
Schweitzer	t	23	23	100	110	116
Caşcaval	t	-	121	250	220	253
Conserve de legume şi fructe	t	-	-	-	-	35
Miere din care:	t	10	20	80	110	320
-*export	t	6	12	52	93	210

Sursa: Comunicări organisme de inspecție şi certificare

Sursa:* Comunicări producători

În cadrul produselor procesate se observă apariția în anul 2004 a conservelor din legume şi fructe, care au lipsit în ceilalți ani de pe piața românească.

Din datele comunicate de producători se observă că o parte din aceste produse sunt valorificate la export în țări cu cerințe mari ca: Germania, Franța, Italia, Elveția, unde s-a exportat aproximativ 30% din producția ecologică vegetală, 12% din produsele procesate din lapte şi aproximativ 65% din mierea de albine obținută ecologic.

14.2.3. Agricultura biologică în fermele legumicole

În fermele legumicole practicarea agriculturii biologice, urmărește optimizarea unor elemente tehnologice cum sunt:

- alegerea terenului;
- rotația și asocierea rațională a plantelor legumicole;
- lucrările de pregătire a solului;
- alegerea sortimentului după criteriul rezistenței la boli și dăunători și a plasticității ecologice;
- înființarea culturilor;
- fertilizarea culturilor legumicole;
- combaterea biologică a buruienilor;
- protecția plantelor față de boli și dăunători;
- recoltarea și valorificarea ulterioară a producției.

14.2.3.1. Alegerea terenului

Solul este un organism viu, care se naște, trăiește dar poate muri, este un produs al acțiunii lumii vii asupra substratului mineral al rocilor, dând naștere la acumulări organice și minerale specifice care sunt rodul activității microbiene și a faunei existente. Alături de plante și animale solul reprezintă baza vieții pe Terra.

Deoarece suprafața solului este limitată, aceasta trebuie folosită cu maximă eficiență. Din suprafața planetei 75% este ocupată cu apă și doar 25% este reprezentată de uscat. Din suprafața de uscat, aproximativ 11% este utilizată în agricultură, care datorită presiunii demografice trebuie să producă din ce în ce mai mult. În ultima vreme se constată că practicile agricole utilizate au condus la o degradare accentuată a solului și la scăderea potențialului productiv al acestuia.

Pentru a asigura un potențial productiv ridicat al culturilor, solul trebuie să fie fertil, iar fertilitatea se datorează în primul rând microorganismelor pe care acesta le conține și plantelor verzi care realizează fotosinteza. Materia organică acumulată prin transformarea în decursul anilor a materiei vegetale și animale în humus prezintă caracteristici variate de la un sol la altul, jucând rolul de matrice organizatoare a vieții la acest nivel. Între flora și fauna solului, pe de o parte și cantitatea de humus din sol, pe de altă parte, există o corelație pozitivă bazată în primul rând pe activitatea microorganismelor care descompun materia organică, transformând-o în humus. Fertilitatea solului este o premisă fundamentală pentru reușita unei agriculturi biologice.

Conținutul în humus al solurilor variază între 1 și 10%, fiind în general mai ridicat în cazul solurilor de pajiște, acolo unde se intervine mai puțin și mai scăzut acolo unde solul se cultivă și se lucrează an de an.

În orice sol se desfășoară concomitent procese constructive și procese distructive. Se poate spune că orice acțiune care duce la acumulare de humus, integrat într-o dinamică continuu creatoare este o măsură care favorizează fertilitatea și deci calitatea biologică a solului, așadar, una din principalele sarcini

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI CHIMIE

ale agriculturii biologice trebuie să fie întreținerea vieții solului și menținerea sau ridicarea conținutului de materie organică.

Introducerea unei cantități de materie organică proaspătă în sol are efecte nefavorabile asupra creșterii plantelor deoarece aceasta determină o activitate microbiană foarte intensă care nu este compatibilă cu viața plantei. Pentru o anumită perioadă elementele nutritive sunt imobilizate, ele fiind folosite de flora microbiană, care în acest mod concurează planta și datorită faptului că, se crează o ambianță de fermentație necorespunzătoare cu condițiile necesare pentru o bună funcționare a țesuturilor rădăcinilor. În acest caz rădăcinile plantelor îți încetează activitatea, se necrozează și mor, fiind apoi, la rândul lor, descompuse de flora microbiană a solului.

Activitatea microbiană durează de la câteva săptămâni la câteva luni până când nu mai rămân în mediu decât materii organice greu atacabile. Atunci, multe microorganisme mor, eliberând compușii lor plasmatici care duc la producerea structurării plasmatice a solului. În acest moment plantele cresc și se dezvoltă foarte bine fiind stimulată în același timp și activitatea faunistică (râme, acarieni, colembole) care ridică fertilitatea solului pe niveluri calitativ superioare.

Pentru a trăi și a acționa în acest fel microorganismele au nevoie de condiții foarte precise și diferite: apă cu săruri dizolvate, aer sau lipsă de aer, grade diferite de aciditate, anumite substanțe organice și anorganice care pot fi descompuse, o anumită temperatură. În condiții optime ele se înmulțesc foarte repede și contribuie la sporirea fertilității solului.

În zona rădăcinii plantelor se realizează diferite grade de colaborare plantă-microorganisme care merg de la simple schimburi de substanțe până la realizarea unor simbioze de tipul nodozităților de la leguminoase.

O activitate microbiană intensă are loc toamna, când părțile vegetative ale celor mai multe plante mor, activitatea fiind încetinită în timpul iernii și din nou accelerată primăvara, astfel încât, în momentul când intră în activitate intensă cele mai multe plante fermentațiile din sol au coborât la un nivel foarte scăzut datorită dispariției materiilor ușor degradabile, plantele fiind în măsură să utilizeze produșii rezultați din descompunere.

În sol se realizează de fapt descompunerea, transformarea și sinteza materiei organice precum și solubilizarea, concentrarea și acumularea elementelor chimice, el reprezentând și habitatul numeroaselor specii de microorganisme care au un rol important în procesul de degradare a poluanților și deșeurilor acumulate.

În agricultura biologică măsurile de ameliorare a solului vizează două obiective esențiale: sporirea fertilității naturale a solului și creșterea activității biologice din sol.

Substanța organică este formată din 85% humus, 10 % rădăcini de plante și 5% flora și fauna solului, constituind "inima" care menține viața acestuia. Din flora și fauna solului 4% reprezintă bacterii, actinomicete, alge și ciuperci, iar 1% protozoare, nematode, colembole, acarieni, miriapode, crustacee, cârțițe, dar mai ales râme, care reprezintă principalul indicator al vieții biologice din sol.

În alegerea terenului destinat culturii plantelor legumicole trebuie să se țină seama atât de amplasarea sa geografică, orografică, hidrografică, pedoclimatică, cât și condițiile social–economice ale zonei și se cere o analiză atentă a calității terenului, privind: grosimea și însușirile fizico-chimice ale straturilor solului (a stratului humic, fertil și stratului mineral); învelișul vegetal al terenului; activitatea biologică (fungi, insecte, viermi, etc.); tipul de granulometrie a terenurilor (textura solului); conținutul în calcar și reacția solului.

Reacția solului sau valoarea pH –ului este de fapt raportul dintre ionii H^+ și ioniii OH^-, adică dintre acizi și baze, în sol, avem de a face cu o valoare medie a lor. Condițiile optime pentru solubilizarea substanțelor minerale și deci și pentru creșterea plantelor se înregistrează în intervalul pH - ului cuprins între 5-7,5.

De asemenea, solul destinat legumiculturii biologice trebuie să fie profund pentru a putea fi străbătut ușor de rădăcinile plantelor și având capacitate bună de reținere a apei.

Pentru realizarea unei exploatații legumicole biologice terenul trebuie să nu fie plasat lângă întreprinderi industriale și combinate chimice, căi ferate, șosele cu trafic intens, care sunt surse de poluare și trebuie să aibă o certificare oficială a faptului că este nepoluat. Gradul de poluare al acestor terenuri se evaluează prin efectuarea de analize complete care depistează existența poluanților și conținutul de elemente poluante din sol.

La alegerea terenului se va ține seama și de faptul că fermele biologice trebuie să fie izolate de fermele convenționale de același profil, realizându-se biosecuritatea acestora.

Biosecuritatea constă în aplicarea unor măsuri tehnice și organizatorice de prevenire a apariției agenților patogeni în interiorul fermei ecologice.

Amplasarea fermelor biologice se va face, pe cât posibil, izolat de alte ferme, se va îngrădi cu garduri de protecție, iar circulația în interiorul fermei se va face numai de persoanele autorizate. Introducerea unor materiale din exteriorul fermei va fi foarte bine controlată pentru a se evita apariția accidentală a unor boli, dăunători sau a unor semințe de buruieni.

Pentru a putea fi acceptată ca fermă biologică este necesară o certificare a acestor ferme, în lipsa certificării (care poate fi acordată doar de organisme abilitate), producția realizată pe aceste terenuri nu poate fi considerată biologică.

14.2.3.2. Rotația și asocierea plantelor legumicole

Asolamentul poate fi considerat o măsură de primă importanță în legumicultura biologică deoarece permite obținerea unor producții mari și de calitate superioară fără alte consumuri energetice.

Fiecare plantă legumicolă prezintă cerințe diferite față de sol, de valoarea pH-ului, de elementele minerale și de apă, cultivarea lor în rotație fiind o condiție esențială pentru ca aceste specii să se dezvolte foarte bine.

Asolamentul în cadrul unei ferme sau a unei grădini care produce legume e de fapt o rotire în timp și spațiu a culturilor de legume existente, atât pentru consum în stare proaspătă, cât și pentru industrializare.

Deoarece realizarea asolamentului nu implică costuri materiale, e bine ca acesta să fie realizat în toate fermele și grădinile legumicole, fiind de fapt cea mai importantă măsură tehnologică în scopul obținerii unor producții de calitate superioară, nepoluate, ecologice.

Plantele legumicole aparținând aceleași familii botanice vor fi cultivate în grădina de legume în fiecare an pe altă parcelă, asigurând în acest fel o rotație corespunzătoare.

Pentru a se putea realiza un asolament corect e necesar ca structura de culturi să cuprindă minimum patru specii sau grupe de specii legumicole din familii botanice diferite, iar dacă se renunță la una din specii ea trebuie să fie înlocuită cu o specie diferită ca familie botanică de cele cultivate în anii anteriori în grădină.

Pentru realizarea unui asolament, o specie legumicolă poate fi înlocuită cu o specie cerealieră, furajeră sau o specie tehnică dacă familia botanică din care face parte e diferită de a speciilor legumicole.

De asemenea, pentru conservarea fertilității solului este foarte important să se cunoască în ce măsură o anumită specie reduce sau îmbogățește solul în humus sau azot pentru a stabili unde vom introduce în asolament speciile mari consumatoare și la ce intervale de timp vom cultiva asemenea specii.

La stabilirea asolamentului se va ține cont și de faptul că la plantele de cultură există specii autotolerante și autointolerante, care dacă sunt cultivate pe aceeași suprafață la intervale mici nu se dezvoltă bine, existând și pericolul înmulțirii excesive a unor boli și dăunători periculoși.

Unele plante legumicole sunt bune premergătoare pentru majoritatea celorlalte specii, de exemplu leguminoasele, care datorită simbiozei cu bacteriile fixatoare de azot îmbogățesc solul în acest element. La stabilirea asolamentului se va ține seama de modul în care premergătoarele influențează negativ sau pozitiv viitoarea cultură.

Pentru a putea realiza un asolament și o rotație corespunzătoare e bine ca terenul să fie împărțit într-un număr de parcele (sole) egal cu numărul de specii care urmează a fi cultivate, iar dimensiunile acestora trebuie să fie egale.

Organizarea și aplicarea în practică a unui asolament creează o serie de avantaje tehnologice a căror consecințe favorabile se mențin în timp:

✓ Diminuarea numărului de agenți patogeni (boli și dăunători) în special a celor care nu migrează. Atacul excesiv de boli și dăunători în cadrul unei ferme legumicole se produce mai ales atunci când nu sunt respectate principiile rotației culturilor. Într-un asolament corect efectuat o specie legumicolă revine pe aceeași suprafață după trei ani, timp în care agenții patogeni nu se mai dezvoltă, deoarece nu au la dispoziție planta gazdă respectivă. Nematozii pot rezista în sol mult timp, o rotație corespunzătoare fiind cea mai bună masură preventivă împotriva apariției lor.

✓ Folosirea eficientă a îngrășămintelor organice, care trebuie de fapt să vitalizeze solul nu să hrănească plantele. Efectul îngrășămintelor organice corect aplicate se resimte pe o perioada de cel puțin 2-3 ani. Nu toate speciile tolerează acest îngrășământ în aceeași măsură. În primul an după aplicarea gunoiului de

grajd reacţionează foarte favorabil: tomatele, ardeiul, vinetele şi varza după care, în următorii ani se cultivă rădăcinoase, bulboase şi păstăioase care nu suportă fertilizarea cu îngrăşăminte organice în anul culturii. Folosirea corectă a îngrăşământului organic ajută şi plantele amelioaratoare ale solului să îşi îndeplinească mai bine rolul, dacă sunt sprijinite printr-o administrare corectă a acestuia.

✓ Reducerea gradului de îmburuienare a terenului. Dacă numărul buruienilor este redus, sunt de dimensiuni mici şi nu sunt plante gazdă pentru anumiţi dăunători sau boli, buruienile pot stimula creşterea plantelor de cultură şi asigură protecţia solului. În cazul monoculturii se înmulţesc excesiv buruieni care de obicei reuşesc să concureze plantele, atât pentru spaţiu, cât şi pentru elementele nutritive din sol, ducând ulterior la pierderi însemnate de recoltă. Prin asolament se alternează pe aceeaşi parcelă, în ani diferiţi culturi prăşitoare sau neprăşitoare, cu talie înaltă sau scundă, care permit efectuarea praşilelor sau care pot înăbuşi parţial creşterea buruienilor, reducând astfel pericolul apariţiei riscului îmburuienării excesive cu buruieni problemă (de exemplu pirul).

✓ Refacerea structurii solului şi creşterea conţinutului de humus al acestuia prin cultivarea plantelor leguminoase (lucernă, trifoi roşu, sparcetă, sulfină albă, mazăre sau fasole), a căror rădăcini realizează simbioze cu bacteriile fixatoare de azot care îmbogăţesc solul în acest element.

✓ Folosirea eficientă a rezervelor de apă şi substanţe minerale din straturile superficiale şi din straturile mai adânci ale solului prin folosirea în asolament a speciilor cu înrădăcinare superficială în alternanţă cu speciile cu înrădăcinare profundă.

Asocierea plantelor legumicole

Este cunoscut efectul pozitiv al asocierii plantelor de cultură precum şi cel al acţiunii defavorabile în cazul unor erori de asociere. Cele mai multe plante legumicole cresc şi se dezvoltă bine împreună, existând însă şi cazuri în care plantele se resping, secretă substanţe toxice cu efect inhibitor sau chiar letal pentru alte plante de cultură, fenomen cunoscut sub numele de alelopatie.

Asocieri favorabile în grădina de legume sunt: salata cu ridichea şi morcovul; castraveţii cu ceapa, fasolea pitică şi urcătoare cu mărar, ţelină asociată cu vărzoase; ceapă cu dovlecel sau mărar, morcovi şi sfeclă roşie; tomatele cu cicoarea de grădină, usturoi şi ţelină, spanac împreună cu praz, pătrunjel alături de sfeclă roşie; usturoiul cultivat lângă sfecla roşie, tomatele împreună cu morcovii şi castraveţi.

Cunoaşterea asocierilor defavorabile este foarte importantă deoarece plantele se concurează reciproc pentru hrană şi apă sau se stânjenesc în creştere şi dezvoltare.

Asocierea fasolei cu varza duce la creşteri vegetative mai mici şi în final la scăderea producţiei de varză. Nu se asociază fasolea cu ceapă, usturoi şi mazăre,

cartofii cu tomatele, varză sau țelină, varză cu ceapă şi usturoi, salata cu pătrunjelul, mazărea cu ceapa şi usturoiul.

Unele asocieri sunt favorabile şi pentru protecția împotriva bolilor şi dăunătorilor: cimbrul asociat cu fasolea îndepărtează păduchii negri, țelina cultivată în apropierea verzei îndepărtează fluturele alb al verzei.

Usturoiul protejează de micoze cartoful şi tomatele; ceapa protejează morcovul împotriva muştei morcovului.

Asocierile dintre plante pot duce şi la modificări ale gustului acestora (pepenele galben cultivat lângă dovlecel devine fad).

14.2.3.3. Lucrările de pregătire a solului

Lucrările solului au ca scop intensificarea activităților biologice, care favorizează procesele de descompunere şi de sinteză, respectiv de formare a humusului şi mineralizare, obținând în felul acesta valori superioare ale substanțelor nutritive.

Orice lucrare agricolă determină o descompunere a humusului prin stimularea activității microbiene şi pierderea trecătoare de structură ca urmare a distrugerii puternice a stratificării naturale a solului.

Factorii meteorologici pot sprijini efectul lucrărilor agricole. Pe solurile grele, gerul mărunțeşte agregatele mai grosiere prin dilatarea apei înghețate, iar în solurile bogate în argile alternanța dintre umezire şi uscare afânează structurile mai compacte, ploile abundente pot provoca spălarea substanțelor nutritive, precum şi a coloizilor şi pot duce la colmatări şi eroziuni ale solului. Aceste daune pot fi combătute preventiv prin executarea lucrărilor la momentul potrivit, prin practicarea unor culturi secundare pentru acoperirea rapidă a terenului după ce s-a arat miriştea, precum şi prin adaosul abundent de materiale organice (gunoi, compost) pentru stabilizarea structurii glomerulare.

Frecvența lucrării solului trebuie restrânsă la minimum pentru a reduce pe cât posibil compactarea produsă de trecerea succesivă a agregatelor şi pentru a asigura solului suficient repaos în vederea sintezei de humus şi a structurării sale. Se consideră că lucrarea adâncă cu plugul şi întoarcerea brazdei duce în timp la scăderea conținutului în humus al solului, la degradarea structurii solului şi la apariția harpantului.

Pentru a evita aceste neajunsuri lucrările solului trebuiesc alternate, cele adânci cu cele de suprafață, uneori se poate renunța chiar la arătură şi se recomandă doar o discuire a solului, deci se va mobiliza doar stratul superficial fără a amesteca orizonturile, iar lucrările mecanice vor fi efectuate întotdeauna la momentul optim şi atunci când solul nu este nici prea uscat nici prea umed. Pentru a avea o lucrare a solului de calitate se poate respecta regula ca în zonele cu climă caldă şi cu mai puține precipitații arătura solului să fie mai adâncă, iar în zonele cu climă rece şi precipitații abundente arătura să fie mai superficială.

Pentru cultura legumelor solul trebuie să fie afânat, bine aşezat şi să îşi păstreze bine umiditatea.

Cu cât o cultură legumicolă necesită mai multe lucrări cu atât este mai dezavantajoasă acțiunea ei asupra solului deci se va încerca introducerea în grădina de legume a unor plante care să necesite mai puține intervenții în succesiune cu cele care necesită intervenții multiple.

14.2.3.4. Fertilizarea terenului și a culturilor în fermele biologice

Realizarea unei fertilități durabile a solului presupune reintegrarea substanțelor minerale, vegetale și animale în circuitul natural al acestuia. În condiții naturale materia organică a solului este întreținută prin aportul de materie de origine animală și vegetală lipsită de viață care cade la suprafața solului, de masa de rădăcini moarte, microorganismele solului ce mor, toate încorporate prin cicluri biologice caracteristice ale biocenozei.

Întrucât întregul mecanism de producție a plantelor se bazează pe o altă orientare fiziologică a acestora, trecerea bruscă de la un sistem chimizat de agricultură la unul biologic determină cel puțin un an de producție scăzută. Pentru a trece de la o o fermă legumicolă convențională la una biologică este necesară o perioadă de conversie de cel puțin 2 ani de zile, timp în care produsele obținute pe aceste suprafețe nu vor putea fi considerate produse ecologice.

Realizarea unei fertilități echilibrate a solului presupune o interacțiune între sol – plante – animale și om, încercându-se, de fapt, reintegrarea în circuitul natural a substanțelor minerale, vegetale și animale prin forțe proprii, în vederea dezvoltării solului ca un organism unitar.

Conținutul solului în humus și azot reprezintă de fapt gradul de fertilitate a solului și capacitatea acestuia de a oferi condiții de creștere și dezvoltare plantelor, iar pentru ridicarea fertilității solului se va interveni doar cu ajutorul unor îngrășăminte naturale, excluzând îngrășămintele chimice.

În legumicultura biologică pentru ridicarea fertilității solurilor se pot folosi:

Îngrășămintele verzi

Îngrășămintele verzi se folosesc în scopul îmbogățirii solului cu materie organică și azot (tabelul 14.5), la descompunerea resturilor organice se degajează cantități însemnate de CO_2 și acizi care au efect benefic asupra plantelor de cultură. Cultivarea solului cu îngrășăminte verzi duce la formarea unui sol glomerular, afânare, îmbunătățirea structurii solului datorită sistemului radicular bine dezvoltat și ameliorarea proprietăților fizice ale solurilor grele prin micșorarea compactității.

Rădăcinile plantelor verzi pătrund la adâncime mare de unde extrag substanțele nutritive și apa iar după descompunerea plantelor acestea rămân în straturile superficiale putând fi ușor folosite de plantele de cultură. Acoperirea solului în perioadele ploioase și în timpul iernii împiedică spălarea elementelor nutritive și protejează solul de eroziune, deflație și înămolire. De asemenea, se intensifică activitatea microbiologică din sol.

Tabelul 14.5

Cantitatea de azot rezultată și procentul de utilizare de către plantele succesive

Planta	Azot (kg/ha)	Procentul de utilizare al azotului
Trifoi roșu	80-120	15-30
Trifoi alb	60-100	25-40
Mazăre	50-80	50-60
Măzăriche	50-80	60-80
Bob	80-140	20-40
Lupin	50-100	20-30
Sparcetă	80-120	20-30

Ca îngrășământ verde se pot utiliza:

Mazărea – se poate utiliza fie mazărea de grădină (*Pisum sativum)* care se poate cultiva și ca plantă alimentară dar și ca îngrășământ verde, fie mazărea de câmp (*Pisum arvense)*, care mai poate fi cultivată și pentru furaj.

Deoarece sunt specii puțin pretențioase la condițiile de mediu se pot cultiva cu succes în toate zonele țării, iar încorporarea lor în sol ca îngrășământ verde trebuie să se facă în timpul înfloritului. Se recomandă cultivarea mai ales pe solurile argiloase pentru a le îmbunătăți structura și pentru ridicarea conținutului lor în azot.

Măzărichea - (*Vicia sativa*) este o plantă puțin pretențioasă la condițiile climatice. Pentru utilizarea ca îngrășământ verde poate fi cultivată și în amestec cu alte leguminoase (fasole), cosirea trebuie să se facă imediat ce au început să se brunifice pastăile inferioare.

Lupinul – cele mai importante specii de lupin sunt: lupinul galben (*Lupinus luteus*), lupinul albastru (*Lupinus angustifolius*) și lupinul alb (*Lupinus albus*). Sunt specii mai puțin rezistente la temperaturi scăzute. Toate speciile de lupin au o înrădăcinare profundă fiind foarte indicate pentru toate tipurile de soluri, de la cele nisipoase până la cele argiloase și chiar pe sărături. Ele ameliorează fertilitatea solurilor și îmbunătățesc structura acestora.

Muștarul alb - (*Sinapis alba*) se folosește mai ales pentru ameliorarea solurilor lutoase, cultura fiind înființată pentru masă verde în luna august.

Hrișca - (Fagopyrum esculentum) se folosește mai ales pentru solurile lutoase și cele sărăturate, ajutând și la combaterea buruienilor datorită ritmului de creștere rapidă. Este recomandată a se folosi în amestec cu alte leguminoase.

Trifoiul (*Trifolium arvense*) și **lucerna** (*Medicago sativa*) se folosesc pentru ameliorarea solurilor și pentru îmbogățirea acestora în azot. Fiind specii rezistente peste iarnă intră în cadrul asolamentelor din fermele legumicole fiind foarte utile pentru refacerea structurii solului.

Ca îngrășământ verde mai pot fi folosite și alte leguminoase ca lintea, soia, fasole, bob, sulfina, sparceta sau seradela, specii care ajută de asemenea, la realizarea unei fertilități durabile, conservarea și regenerarea fertilității solurilor pe care se cultivă.

Îngrăşămintele verzi pot fi cultivate **în ogor propriu**, în **cultură premergătoare** sau **succesivă** şi în **culturi asociate.**

Culturile în ogor propriu sunt folosite mai ales pe solurile epuizate şi care necesită refacerea structurii (asolamente cu sole săritoare), se cultivă trifoi sau lucernă care se desfiinţează după 2–3 ani.

În **culturi premergătoare** sau **succesive** se cultivă plante **rezistente la ger** (culturi acoperitoare) care permit înfiinţarea în timpul iernii. Aceste culturi se fac cu scopul de a împiedica spălarea elementelor nutritive din sol. Se seamănă după desfiinţarea culturilor de legume iar primăvara se toacă cu maşina de tocat vreji şi se încorporează în sol prin arătură sau discuire la adâncime mai mare. Se pot cultiva şi **plante sensibile la ger** care prezintă avantajul că se pot încorpora uşor primăvara, nemaifiind nevoie de tocarea prealabilă şi se descompun mult mai uşor.

În **cultură asociată**, se poate cultiva soia, bobul furajer sau trifoiul în această asociere plantele verzi vor concura legumele pentru apă şi hrană şi se vor obţine producţii mai mici.

În **vegetaţie** pentru fertilizarea culturilor se mai pot folosi şi alte preparate obţinute din plante ca:

Turtele de ricin

Conţin 5-6%N_2, 1,5-2%P_2O_5, 1-2% K_2O. Este un îngrăşământ bogat în elemente nutritive.

Plămădeala de urzică

Este un îngrăşământ ce se foloseşte la fertilizare suplimentară prin stropirea plantelor în perioada de vegetaţie sau prin udarea solului. În cazul stropirii plantelor se foloseşte o diluţie 1:20 iar la fertirigare se foloseşte o diluţie 1:10. Plămădeala de urzică are valoare de îngrăşământ complex cu macro şi microelemente. Conţine 0,15% materie organică, 0,07% N, 0,003% P_2O_5, 0,021% K_2O, 0,026% CaO. Se foloseşte la: tomate, castraveţi, ţelină, praz.

Îngrăşămintele naturale de origine vegetală şi animală

Compostul de origine mixtă

Compostul este produsul fermentării aerobe a diferitelor resturi organice dispuse în grămezi. Compostul poate fi utilizat la fertilizare la toate culturile legumicole.

În cazul folosirii lor directe reziduurile verzi trebuie lăsate câteva zile la suprafaţa solului înainte de a se încorpora.

Este un îngrăşământ natural format din materiale de origine vegetală şi animală în proporţii diferite. Pentru compostare se pot utiliza amestecuri de materii de origine vegetală: frunze, tulpini de floarea soarelui, coceni de porumb, fructe stricate, tescovină, paie, rumeguş, scoarţă de copac, gunoi menajer degradabil, turbă, etc şi materiale de origine animală: gunoi de grajd de la bovine, cabaline, porci, gunoi de păsări, oase zdrobite, coji de ouă, sânge de animal, etc., precum şi produse lichide: urină, must de gunoi de grajd.

În compostul destinat fertilizării legumelor nu trebuie să se folosească resturi vegetale provenite din același tip de culturi deoarece există posibilitatea transmiterii germenilor de boli și dăunători.

Materialele care nu se folosesc la compostare sunt: metale, sticlă, plastic, cauciuc, buruieni purtătoare de semințe cu germinația bună.

Inițial se face precompostarea în silozuri prin colectarea zilnică a deșeurilor menajere, la care se adaugă materialele destinate compostării, din curte, din grădină sau din afara gospodăriei. Precompostarea se referă la materialele proaspete, care se stratifică în siloz cu circa 30% materiale uscate, la care se adaugă în cantități mici pământ și var stins. Materialele grosiere (tulpini, vreji, etc.) se taie la dimensiuni mici de 5 cm.

Compostarea propriu-zisă începe când s-a acumulat cel puțin $1m^3$ de materiale. Mai întâi, materialele se amestecă și se omogenizează foarte bine. De regulă se practică două compostări pe an, una primăvara și una toamna. Compostarea de primăvară este mai rapidă decât cea de toamnă. Compostarea începe în momentul în care temperatura în grămezi ajunge la 40-60°C, iar procesul se petrece aerob.

Platforma de compostare se instalează direct pe pământ pentru a permite râmelor și altor viețuitoare care participă la compostare să pătrundă în compost, fiind ales în acest scop un loc umbrit. La fundul grămezii se așează un strat de 20 cm din materiale grosiere, peste acesta se așează materiale precompostate cu o grosime a stratului de 30-50 cm. Deasupra se împrăștie ingredientele de compostare. Pe parcursul înălțării grămezii se procedează la umeziri repetate cu apă și plămădeală de urzică. Urmează un strat de 0,5-1 cm de balegă uscată de bovine, sol într-un strat de 3-5 cm și amendament, varul stins. Platforma se fa construi în formă trapezoidală, lățimea la bază fiind de 2,5–4 m iar la partea superioară 1m. Înălțimea grămezii poate ajunge până la 80-120 cm, fiecare grămadă de compostare se acoperă cu un strat subțire de paie sau fân și în final cu o folie de plastic pentru a nu permite ca pe parcursul compostării unele elemente nutritive să se solubilizeze și să pătrundă în sol. Platforma trebuie să aibă o umiditate de 65–70%, fiind necesară udarea periodică cu urină sau must de gunoi.

Materialele vor fi așezate în platformă afânat, fără tasare deoarece excesul de umiditate și tasarea prea puternică întârzie începerea fermentației.

În acest compost se pot adăuga preparate biodinamice, preparate bacteriologice și enzimatice care favorizează descompunerea materialelor compostate și sinteza substanțelor humice.

O metodă simplă de compostare este compostarea de suprafață sau la rece care se poate practica în cazul legumelor mari consumatoare de azot, când dispunem de gunoi de grajd proaspăt sau de cantități mari de resturi vegetale rămase pe câmp. Aceste materiale se încorporează toamna târziu, urmând ca în primăvară să se repete mobilizarea adâncă cu furca sau cazmaua. Până primăvara are loc o semidescompunere a materiei organice.

Îngrăşămintele naturale de origine animală
Gunoiul de grajd

În agricultura biologică gunoiul de grajd este recomandat ca mijloc de bază pentru ridicarea fertilităţii solurilor, el poate fi utilizat în stare proaspătă, parţial fermentat sau complet fermentat.

Fermentarea se poate realiza pe cale aerobă prin:

✓ fermentare în grămezi mici depozitate la capătul parcelei ce urmează a fi fertilizată;

✓ depozitarea şi fermentare în grămezi mari, pe platforme betonate;

✓ compostarea gunoiului prin amestecarea cu pământ, nisip sau făină de rocă în prisme de compostare;

✓ în variantă de compostare la suprafaţa solului în culturile de legume care suportă bine acest îngrăşământ (cartofii, tomate castraveţii, varză). Gunoiul proaspăt se aşează în strat subţire de 10-12 cm, se încorporează superficial după o compostare la suprafaţă de 3-4 săptămâni, caz în care pierderile de azot sunt compensate prin stimularea procesului de fixare biologică a azotului datorită unor compuşi care iau naştere în cazul compostării. Pe un hectar de cultură se pot aplica 15-30 t gunoi de grajd, odată la 2-3 ani.

Toate speciile de animale furnizează un gunoi valoros (tabelul 6). Pentru realizarea unei fertilizări echilibrate amestecarea gunoiului provenind de la diferite specii de animale este benefică.

Din punct de vedere al compuşilor chimici, gunoiul proaspăt conţine: *hidraţi de carbon*: celuloză, hemiceluloză, lignină, zaharuri ş.a; *compuşi cu azot:* proteine, aminoacizi, acizi organici, amoniac; *lipide*; un număr însemnat de *hormoni* care stimulează microorganismele şi plantele.

Fertilizarea cu gunoi de grajd prezintă numeroase avantaje deoarece: conţine întregul complex de elemente nutritive necesare plantelor; este un îngrăşământ corespunzător majorităţii plantelor de cultură; se poate folosi pe toate tipurile de sol dar cu precădere pe solurile sărace în humus, nestructurate sau cu tendinţe de degradare, cărora le îmbunătăţeşte calităţile; mineralizarea substanţelor nu este foarte rapidă ca urmare nitraţii sunt eliberaţi treptat; are o acţiune benefică asupra activităţii macro şi microorganismelor din sol cărora le stimulează activitatea.

Tabelul 14.6

Conţinutul mediu de elemente din gunoiul de grajd

Gunoi proaspăt de:	N %	P_2O_5 %	K_2O %	CaO	MgO	Substanţă organică %
Taurine	0,40	0,20	0,50	0,45	0,10	20,3
Cabaline	0,60	0,28	0,53	0,25	0,14	25,4
Ovine	0,80	0,23	0,67	0,33	0,18	31,8
Porcine	0,55	0,75	0,50	0,40	0,20	18,0
Păsări	1,70	1,60	0,90	2,00	0,20	0,3

Raport	N:	P_2O_5:	K_2O:	MgO:	K_2O:	MgO:
Taurine	100	50	125	25	5	1
Cabaline	100	48	88	23	3,8	1
Ovine	100	29	84	22	3,7	1
Porcine	100	136	91	36	2,5	1
Păsări	100	94	53	12	4,5	1

Sursa: Faust, 1980

Aplicarea gunoiului de grajd are efecte pozitive asupra solurilor deoarece realizează o coeziune mai bună a particulelor de sol, o mai bună capacitate de reținere a apei, creșterea capacității de schimb cationic și reducerea pierderilor de elemente prin levigare pe solurile nisipoase, o mai bună permeabilitate pentru apă și aer cu reducerea băltirilor, reducerea gradului de comapactare și o mai ușoară penetrabilitate a rădăcinilor în solurile argiloase, ameliorarea acidității, contracararea efectului negativ al sodiului schimbabil pe solurile solonețizate, a carbonaților pe solurile alcalinizate și a sărurilor solubile pe solonceacuri și solurile sărăturate.

Aplicarea gunoiului de grajd în cadrul unor asolamente bine stabilite în fermele legumicole e bine să se facă odată la 2-3 ani, unele culturi valorificând foarte bine efectul remanent al îngrășămintelor organice.

Aplicarea gunoiului de grajd se face toamna la pregătirea de bază a terenului, în condiții meteorologice favorabile, fără ploaie, ninsoare sau soare puternic și se vor evita terenurile cu exces de apă sau acoperite de zăpadă și cele puternic înghețate.

La aplicarea pe teren se va urmări uniformitatea distribuirii îngrășământului pe întreaga suprafață. Pe măsură ce gunoiul se împrăștie, terenul se ară cu plugul la adâncimea de 25–28 de cm.

Mustul de gunoi care se obține pe lângă gunoiul solid are un conținut bogat în amoniac dar acesta se poate pierde ușor. Pentru a împiedica pierderile de azot colectarea mustului trebuie să se facă în bazine special pregătite pe fundul cărora se așează un strat de paie și apoi compost bine maturat în strat de 20 cm. Periodic în must se pot adăuga preparate biodinamice pentru a grăbi fermentarea și a îmbogăți mustul. Se poate aplica pentru fertilizarea de bază în doze de 40 – 60 t/ha/an sau la fertilizarea culturilor în vegetație 10 – 20 t/ha amestecat cu 2-3 părți apă.

Urina este un îngrășământ natural bogat în potasiu și azot, dar pentru a putea fi folosită la fertilizarea culturilor se amestecă cu apă 2-3 părți care leagă amoniacul și diluează toxinele. Urina se poate amesteca cu compost sau cu gunoi de grajd uscat și se poate administra în orice perioadă a anului pentru fertilizarea solurilor sau a plantelor în vegetație.

Dejecțiile semifluide de la bateriile de creștere a păsărilor au un conținut de substanță uscată de maxim 15% și sunt foarte bogate în potasiu. Pentru a putea fi aplicate pe sol trebuie obligatoriu omogenizate și apoi după aplicare se încorporează imediat la 10–20 cm.

Făina de sânge se utilizează ca fertilizant în perioada creşterii vegetative prin stropirea plantelor sau a solului, în concentrație 1-2%

Făina de oase se foloseşte toamna pentru fertilizarea solurilor prin încorporare superficială.

Fertilizarea minerală în agricultura biologică

Fertilizarea minerală aplicată în agricultura biologică se deosebeşte de cea utilizată în agricultura bazată pe chimizare prin aceea că nu se folosesc decât produse naturale, greu solubile şi este mai mult sau mai puțin dependentă de tipul de cultură şi se poate aplica în completarea fertilizării cu îngrăşăminte organice. Ea se utilizează pentru corectarea unor carențe şi pentru îmbunătățirea însuşirilor fizice ale solului. Îngrăşămintele minerale naturale cele mai utilizate sunt pulberile de roci silicioase, roci calcaroase, făină de bazalt, făină de granit, dolomite, făină de fosforiți, săruri brute de potasiu, tufuri vulcanice precum şi alge marine calcaromagneziene.

Ca produse ale activității industriale sunt acceptate unele produse ca: zgura lui Thomas şi minereurile ce conțin potasiu şi magneziu: kainit, carnalit, produse minerale care conțin siliciu, etc.

Îngrăşăminte minerale naturale:

Calcarul de alge

Prin conținutul bogat în macroelemente şi microelemente este un îngrăşământ natural deosebit de valoros. Conține 6% substanță organică, 2,8% N, 0,2% P_2O_5, 2,3% K_2O, 1% MgO 1,2% CaO. Este o substanță solubilă în apă şi se utilizează mai ales ca îngrăşământ suplimentar pentru stropiri foliare. Se poate folosi şi ca pulbere de prăfuit care se poate aplica direct pe sol sau pe frunzele plantelor având efect de îngrăşământ foliar, dar se constată şi un efect de îndepărtare al omizilor şi păduchilor de frunze. De asemenea, este un bun ingredient pentru compostare.

Azotatul de sodiu din Chile conține 16% N, fiind singurul produs mineral cu azot. Se foloseşte la fertilizarea în vegetație a culturilor.

Făina de fosforite

Se obține din zăcăminte naturale existente în Africa de Nord. Este insolubilă în apă. Se foloseşte ca îngrăşământ de bază. Conține 26,6% P, 1,1% Mg, 48,0% Ca.

Fosfatul natural de Cioclovina

Este un îngrăşământ natural rezultat prin descompunerea cadavrelor şi a excrementelor de lilieci din peştera cu acelaşi nume. Conține 9-25% P. Se solubilizează lent şi are acțiune de îngrăşare pe o perioadă mai lungă de timp.

Făina de dolomită

Este îngrăşământ valoros care se extrage din cariere şi în țara noastră utilizat pentru păstrarea echilibrului potasiu/magneziu. De asemenea, se poate folosi şi ca amendament. Înainte de utilizare se mărunțeşte foarte fin. Conține 0,8% K, 6,4% Mg, 22% Ca.

Kiseritul este un mineral prezent în zăcămintele de săruri cu potasiu care conține cantități însemnate de magneziu.

Făina de bazalt

Provine din măcinarea bazaltului, o rocă vulcanică. Se mai numește și făină de lavă. Făina de bazalt se folosește astăzi pe scară largă în calitate de ingredient pentru unele composturi, ca îngrășământ și în unele cazuri ca preparat fitofarmaceutic.

Tabelul 14.7

Compoziția chimică medie a unor roci de bazalt

Elemente	Compoziția chimică (%)
Siliciu(SiO_2)	48,3
Aluminiu(Al_2O_3)	19,2
Calciu(CaO)	8,1
Magneziu(MgO)	8,3
Fier(Fe_2O_3)	8,1
Potasiu(K_2O)	1,7
Sodiu(Na_2O)	2,6
Mangan(MnO_2)	0,1
Fosfor(P_2O_5)	0,5
Cupru, zinc, nichel, seleniu, bor, sulf,	urme (10 – 100 ppm)

Kalimagnezia un îngrășământ ușor solubil care conține 26% potasiu și 5 % magneziu, se poate folosi pentru fertilizare în timpul vegetației.

Tuful vulcanic

Se folosește în stare măcinată, are o compoziție complexă cu fier, potasiu și microelemente, zăcăminte de tuf vulcanic fiind prezente și în România

Roci silicioase măcinate (bazalt, cuarț, granit, porfir, feldspat) se folosesc pentru fertilizarea solurilor (200 – 1000 kg/ha) sau pentru fertilizarea plantelor 10 g la 100 l apă. Fertilizarea se face în cursul perioadei de vegetație prin stropiri pe frunze, alături de efectul fertilizant se observă și o mărire a rezistenței plantelor la atacul bolilor și dăunătorilor de sol.

Zgura lui Thomas este un produs rezidual rezultat din industria metalurgiei. Se poate folosi ca amendament.

Menținerea și ameliorarea fertilitatații solului și a activitatații biologice a acestuia se poate realiza și cu ajutorul unor biopreparate.

Nitragin - biopreparat ce conține culturi bacteriene, se folosește pentru tratamentul semințelor înainte de semănat

Biotrofin - stimulator de creștere bacteriană (conține *Azotobacter chroococcum* și *Bacillus megaterium*) se aplică înaintea însămânțării, încorporat prin discuire.

Modul de folosire a îngrăşămintelor naturale în agricultura biologică

Plantele legumicole necesită un sol cu un conţinut mai ridicat de humus. Îngrăşămintele trebuie aplicate cu regularitate după o analiză foarte atentă a solului.

Nu este posibilă fertilizarea numai cu îngrăşăminte organice, îngrăşămintele minerale se aplică în compensaţie pentru a suplini necesarul de elemente minerale care lipsesc din îngrăşământul organic. Recolte mari şi sănătoase se obţin numai prin folosirea concomitentă a îngrăşămintelor organice şi a celor minerale naturale.

Deoarece îngrăşămintele minerale care se utilizează în agricultura biologică sunt greu solubile acestea trebuie aplicate în sol toamna pentru culturile din anul următor.

Se pot administra şi primăvara, dar pe solurile nisipoase care prezintă un orizont arabil puţin profund şi unde există pericolul spălării.

Pentru fertilizări în vegetaţie se folosesc soluţii din aceste îngrăşăminte sau se apelează la îngrăşămintele organice.

Corectarea reacţiei solului

Solurile, datorită modului lor de formare sunt amestecuri de rocă nealterată, minerale argiloase, acizi humici, oxizi, etc. Valoarea pH-ului este dată de raportul dintre acizi şi baze. Plantele legumicole cresc şi se dezvoltă bine la un pH cuprins între 6 şi 7.

În mod normal în roci ar trebui să fie prezente substanţe minerale care atunci când trec în soluţia solului în urma alterării ar trebui să fie suficiente pentru creşterea plantelor. Datorită faptului că uneori alterarea se petrece cu intensitate mare iar mineralele sunt spălate solurile devin acide, alteori alterarea nu este suficient de avansată iar solurile sunt calcaroase. Solurile cu un pH sub 6 sau cele cu pH-ul mai mare de 7 necesită corectarea reacţiei în vederea aducerii acesteia în domeniul optim (tabelul 14.8).

În acest scop se folosesc amendamente şi unele materiale cu reacţie fiziologic acidă sau alcalină.

Tabelul 14.8

Materiale pentru amendarea solurilor acide

Materialul	Cantitate	Timp de acţiune
Făina lui Thomas	0,3-0,5 kg/m^2	rapid
Cenuşa de lemn	0,05-0,1 kg/m^2	rapid
Făină de dolomită	0,1-0,2 kg/m^2	mijlocie
Făină de bazalt	0,1-0,2kg/m^2	mijlocie
Compost fermentat	6-12 kg/ha	lentă

Pentru amendarea solurilor alcaline se folosesc următoarele sortimente de materiale (tabelul 14.9):

Tabelul 14.9

Materiale pentru amendarea solurilor bazice

Materialul	Cantitate	Timp de acțiune
Must de gunoi de grajd	30-40l/m^2	rapid
Urină de animale (diluată cu apă 1:2)	30-40l/m^2	rapid

14.2.3.5. Alegerea sortimentului după criteriul rezistenței la boli și plasticității ecologice

Dintre factorii de care depind productivitatea și calitatea legumelor, soiul sau hibridul este cel mai important, deoarece în condițiile aplicării unei tehnologii corespunzătoare potențialul său biologic și tehnologic va fi la parametri maximi.

Pentru cultura legumelor, în trecut existau soiuri locale, care fiind adaptate condițiilor specifice puteau fi cultivate cu succes, dar aceste soiuri realizau de obicei producții mici. Ulterior s-au creat soiuri productive dar care sunt mai sensibile la boli și dăunători, la factorii meteorologici extremi, cât și la concurența buruienilor. Pentru protecția acestor soiuri este necesară folosirea excesivă a tratamentelor fitosanitare.

În prezent s-au creat semințe hibride cu rezistență la boli și dăunători care se comercializează atât în țările cu tehnologie agricolă avansată cât și în țara noastră pentru cele mai importante specii de legume cultivate în câmp, sere și solarii. Pentru a reduce sau a elimina tratamentele fitosanitare în cultura de legume, o importanță deosebită o reprezintă procurarea și utilizarea unor semințe sau a unui material săditor liber de boli și dăunători din soiuri și hibrizi recomandați pentru legumicultura biologică. Pe ambalajele unor semințe din soiuri sau hibrizi cu rezistență sau toleranță la boli și dăunători, este înscrisă recomandarea „bio".

Achiziționarea unor astfel de semințe trebuie făcută de la societăți bine cunoscute pe piața europeană și pe cea națională.

Utilizarea unor semințe hibride cu rezistență la boli și dăunători cu capacitate de adaptare la condițiile de mediu poate reprezenta o garanție a obținerii unor producții biologice sigure.

În culturile biologice se interzice utilizarea semințelor provenite de la organisme modificate genetic, dar se pot utiliza plante înmulțite "in vitro".

14.2.3.6. Înființarea culturilor

Culturile de legume se pot înființa fie prin semănat direct în câmp, fie prin răsad.

La **semănatul direct** în câmp se va folosi sămânță care să corespundă unor cerințe de calitate. Semințele utilizate trebuie să fie împachetate în ambalaje închise etanș, etichetate, să aibă inscripționat pe ambalaj: denumirea cultivarului, numărul de semințe sau greutatea acestora și termenul de garanție. Cantitățile mai mari de semințe sunt însoțite de certificate care atestă și starea fitosanitară bună a lotului respectiv.

Agricultorii ecologici doresc să poată beneficia de semințe ecologice de calitate comparabilă cu cele convenționale. Garanția calității semințelor se materializează printr-o stare sanitară bună, care poate fi compromisă în special la producerea seminței, când există posibilitatea contaminării cu anumite boli care se pot transmite pe această cale.

Semințele pot fi dezinfectare înainte de folosire printr-o metodă care să fie compatibilă cu principiile agriculturii ecologice. Se utilizează foarte mult termoterapia pentru tratarea semințelor sau se utilizează băile de semințe cu preparate biodinamice.

Aplicarea acestor tratamente are ca efect o germinare mai rapidă și o stimulare a creșterii ulterioare a plantelor, care prezintă un sistem radicular mai profund, sunt mai sănătoase și mai productive decât plantele netratate.

Pentru tratamentul semințelor se poate folosi preparatul de valeriană (la semințele de tomate, ceapă, țelină, praz), coada șoricelului și muștețelul sunt indicate pentru îmbăierea semințelor de leguminoase, ridichi de lună și vărzoase, iar preparatul din coajă de stejar se utilizează pentru semințele de salată și pentru tratamentul tuberculilor de cartof.

Mărimea, forma și greutatea semințelor trebuie să fie cele tipice pentru fiecare specie în parte, iar semințele trebuie să fie bine maturate.

De asemenea, se va acorda o atenție deosebită purității semințelor, prezența unor semințe de buruieni sau semințele altor plante de cultură fiind dăunătoare.

Capacitatea de germinare și conținutul în apă al semințelor trebuie să fie optime.

Adâncimea de semănat depinde de dimensiunea semințelor, de calitatea solului și de regimul precipitațiilor din zonă. Astfel, semințele de dimensiuni mari se vor introduce în sol mai adânc decât semințele de dimensiuni mici, totuși adâncimea trebuie să fie limitată deoarece semințele au nevoie de oxigen pentru a germina. În zonele cu precipitații abundente semănatul se face mai superficial decât în zonele cu climat uscat.

Dacă aceste măsuri sunt respectate semințele plantelor vor răsări mai repede decât buruienile și nu vor mai fi concurate de acestea.

În legumicultura biologică se interzice tratarea chimică a semințelor, iradierea sau tratarea cu microunde.

Foarte multe specii legumicole se înființează prin răsad.

Producerea răsadului este o activitate importantă pentru obținerea unui material săditor cu stare fitosanitară foarte bună sau complet liber de boli și dăunători, care să asigure ulterior o dezvoltare bună a culturilor legumicole.

În locurile unde se produc răsaduri măsurile tehnologice care se impun sunt foarte stricte respectarea lor condiționând obținerea de răsaduri de calitate lipsite de atacuri de boli și dăunători.

Principalele măsuri care contribuie la prevenirea atacurilor de boli și dăunători sunt următoarele:

- ✓ efectuarea la timp a lucrărilor de semănat și repicat, lucrări care trebuie executate doar de muncitori calificați;

- ✓ înainte de începerea operațiunilor de semănat se vor dezinfecta spațiile de cultură, materialele și uneltele prin tratare cu soluții concentrate (3-5%) de sulfat de cupru;
- ✓ utilizarea în tehnologia de producere a răsadurilor a unor materiale noi (lădițe, folii, prelate, rogojini, s.a.), care nu sunt infestate cu germeni de boli și dăunători;
- ✓ utilizarea ca substrat a materialelor libere de boli și dăunători cum sunt turba, perlitul, vermiculitul sau chiar vata minerală;
- ✓ folosirea în exclusivitate a semințelor libere de boli și dăunători, procurate de la firme specializate în producerea semințelor;
- ✓ dirijarea corectă a factorilor de vegetație pe toată perioada de obținere a răsadurilor, care contribuie la asigurarea în acest fel a unei stări fiziologice bune a acestora și previne apariția atacurilor unor boli;
- ✓ limitarea accesului în spațiile folosite pentru producerea răsadurilor, unde trebuie să intre numai cei care efectuează lucrări;
- ✓ instalarea unor dezinfectoare simple la intrarea și ieșirea din spațiile unde se produc răsaduri;
- ✓ ambalarea și transportul răsadurilor utilizând materiale și mijloace de transport care nu sunt infestate cu boli și dăunători.

Prin aplicarea riguroasă a acestor măsuri preventive, se pot produce răsaduri de calitate foarte bună lipsite de boli și dăunători.

14.2.3.7. Lucrări de îngrijire aplicate culturilor de legume

Lucrările de îngrijire aplicate culturilor de legume realizate în sistem biologic în perioada vegetației sunt:

Completarea golurilor se va efectua la culturile înființate prin răsad folosind răsaduri reținute pentru acest scop care trebuie să fie din același lot cu cele plantate inițial. Completarea golurilor trebuie efectuată ori de câte ori este nevoie, prezența unor goluri ducând la o diminuare a producției pe de o parte și la riscul îmburuienării pe de altă parte, deoarece locurile rămase libere vor fi invadate imediat de buruieni.

Răritul, o lucrare necesară în culturile însămânțate și unde desimea culturii este mai mare decât cea optimă. Lucrarea se execută cu atenție eliminând plantele bolnave, slab dezvoltate, sau cele atacate de boli sau dăunători, în așa fel încât să existe certitudinea că cele care au rămas se vor dezvolta foarte bine. Pentru a preveni riscul îmbolnăvirilor se recomandă ca plantele smulse să fie scoase de pe teren și duse la platforma de compostare.

Combaterea buruienilor

Conceptul de buruieni - "infestanti" sau "mal-erbe" - are o semnificație negativă în accepțiunea omului care nu privește atent lucrurile, dar, de fapt ele pot fi plante medicinale sau cu valoare furajeră, care permit structurarea ecosistemului natural.

Aceste buruieni trebuie îndepărtate doar atunci când concurează speciile cultivate. Îndepărtarea lor trebuie efectuată doar prin măsuri nepoluante fiind interzisă aplicarea erbicidelor pentru combaterea lor.

O măsură importantă este aceea de alegere a unor specii şi soiuri care să facă faţă concurenţei buruienilor.

Pentru distrugerea se poate recurge la folosirea îngrăşămintelor verzi, acoperirea solului cu materiale specifice, mulcirea solului cu diferite materiale inclusiv cu folie de Agryl de culoare neagră care împiedică formarea buruienilor şi nu ridică temperatura solului.

Alte metode de combatere pot fi: smulgerea buruienilor înainte de a forma seminţe acestea putând fi utilizate ca mulci sau la compostare.

Buruienele dacă ajung să concureze plantele, consumă apa şi substanţele nutritive din sol acestea nemafiind disponibile plantelor de cultură, de asemenea, multe din ele sunt plante gazdă pentru unii dăunători şi germeni de boli. Avându-se în vedere consecinţele dăunătoare ale prezenţei buruienilor pe teren, cultivatorul de legume ecologice trebuie să ia măsuri de distrugere mecanică a acestora prin plivit şi prăşit când plantele legumicole sunt mici şi pot fi uşor concurate de buruieni. Îndepărtarea buruienilor e bine să se facă pe măsură ce acestea apar şi sunt slab dezvoltate.

Folosirea unei scheme optime de rotaţie este de asemenea, benefică pentru îndepărtarea buruienilor, alternarea unor specii care distrug buruienile cu cele care se îmburuienează repede duce la o slăbire a rezervei de buruieni din sol.

Lucrările de pregătire a terenului arat, grăpat, efectuate la timp şi în condiţii optime conduc la o micşorare a numărului de buruieni din sol.

Pentru prevenirea atacurilor unor insecte dăunătoare (cum sunt de exemplu puricii negri) în imediata apropiere a culturilor ecologice, buruienile de pe marginea drumurilor sau de pe haturi trebuie distruse deoarece constituie un adăpost de calitate foarte bună pentru dăunătorii menţionaţi. Uneori însă se constată că dăunătorii preferă să atace buruienile şi mai apoi plantele de cultură.

Apa de irigat din surse de suprafaţă (cursuri de apă, bazine de acumulare sau lacuri) este purtătoare a unui număr mare de seminţe de buruieni. O grădină ecologică trebuie să aibă în vedere filtrarea apei de irigat pentru reţinerea seminţelor de buruieni existente care constituie o sursă potenţială de îmburuienare a culturilor irigate.

Buruienile mai pot fi combătute şi termic, prin tratament de ardere cu flacăra arzătoare cu propan, metodă care este foarte costisitoare şi care se poate aplica pe vetrele cu buruieni foarte greu de distrus prin alte metode.

Irigarea culturilor biologice trebuie efectuată foarte atent deoarece pentru certificarea condiţiilor impuse amplasamentelor culturilor ecologice calitatea şi gradul de poluare a apei sunt deosebit de importante.

Aplicarea corectă a irigaţiilor folosind apa nepoluată, prezintă o serie de avantaje:

- ✓ asigurarea metabolismului normal al plantelor contribuie la obținerea producției cantitative și calitative corespunzătoare;
- ✓ desfășurarea fenofazelor: germinare, răsărire, creștere vegetativă la momentele optime duce la o dezvoltare corectă a plantelor de cultură acestea fiind în măsură să concureze buruienile;
- ✓ prezența apei în sol duce la o înrădăcinare corespunzătoare a plantelor, la explorarea unui volum suficient de sol și la ridicarea capilară a apei conținând substanțele nutritive spre zona de înrădăcinare;
- ✓ plantele crescute în condiții optime de aprovizionare cu apă și substanțe nutritive, sunt mai viguroase, mai rezistente la factorii nocivi, necesitând mai puține intervenții de protecție contra bolilor și dăunătorilor;

Utilizarea apelor de suprafață sau din lacuri este posibilă doar dacă este total lipsită de poluanți deversați de sistemele de canalizare ale localităților fără stații de epurare sau de cei care provin din activități industriale.

Utilizarea apei poluate pentru irigarea culturilor de legume este total contraindicată chiar pentru producția comercială obișnuită. Irigarea cu apă poluată a culturilor ecologice duce la compromiterea în totalitate a produselor.

Metoda de udare cea mai frecvent folosită este cea prin aspersiune cu conducte îngropate sub presiune. Se mai practică și irigarea prin scurgere la suprafață, iar în ultimul timp se practică tot mai mult irigarea prin picurare care prezintă și avantajul realizării unei economii de apă.

Fertilizarea fazială este o lucrare foarte importantă pentru realizarea unui nivel ridicat al producției de legume. Pentru fertilizarea fazială se pot utiliza îngrășăminte organice și îngrășăminte minerale naturale, doar cele cu grad ridicat de solubilizare.

În fertilizarea fazială se pot folosi îngrășăminte extraradiculare ecologice (foliare); aceste fertilizări se aplică prin stropirea fină a aparatului foliar al plantelor, folosindu-se echipamente pentru tratamente fitosanitare. Picăturile foarte mici de soluție rămase pe suprafața frunzelor după tratament pătrund în plantă într-un interval de timp foarte scurt.

Datorită acestui mod de preluare directă a îngrășămintelor foliare de către plante efectul fertilizării extraradiculare este foarte rapid și eficient chiar dacă se utilizează doze foarte mici. În afara macroelementelor principale (azot, fosfor, potasiu) îngrășămintele extraradiculare conțin cantitățile necesare de microelemente care sunt de strictă utilitate pentru speciile legumicole.

Pentru fertilizările faziale se pot utiliza unele îngrășăminte foliare care se comercializează și în țara noastră:

Azotofertil - biofertilizator (conține *Azotobacter chroococcum* și *Azospirillium lipoferum*) se poate utiliza la pregătirea patului germinativ și la stropirea culturilor în timpul vegetației.

Cropmax - fertilizant ce conține macroelemente, microelemente, aminoacizi organici precum și stimulatori de creștere, vitamine și enzime.

Se poate aplica la plante în timpul vegetației prin pulverizare fină pe frunze. Se recomandă folosirea a 500 ml – 1000 ml la hectar pe tratament si 1–3 tratamente în perioada de vegetație în funcție de cultura legumicolă la care se utilizează.

Biofert - îngrășământ foliar care asigură un supliment de macro și microelemente. Se aplică 2,5 – 5 l/ha diluat în 250 l apă, 2-3 fertilizări în timpul perioadei de vegetație.

Pentru fertilizarea culturilor se poate face și mulcirea cu mraniță sau îngrășăminte organice semidescompuse, la specii care au înrădăcinare superficială (cum sunt castraveții, ardeii și altele) și pot fi irigate și prin aspersiune; mulcirea cu îngrășăminte organice are efecte pozitive atât asupra condițiilor de temperatură și umiditate din sol cât și asupra îmbogățirii solului cu elemente nutritive, care fiind solubilizate în timpul udărilor trec din materialul de mulcire în sol de unde sunt absorbite de sistemul radicular al plantelor.

Protecția împotriva bolilor și dăunătorilor

Reprezintă lucrarea de îngrijire de cea mai mare importanță pentru culturile de legume ecologice și cuprinde toate măsurile care se iau pentru mărirea capacității de rezistență a plantelor cultivate și împiedicarea dezvoltării insectelor, a animalelor dăunătoare sau a agenților patogeni vegetali.

Pe plan mondial, pot fi realizate unele culturi ecologice de legume cum sunt: ridichi de lună, spanac, salată, vărzoase timpurii, tomate în sere, mazăre și fasole de grădină, praz, cartofi timpurii și altele.

La aceste specii există cultivaruri cu rezistență și toleranță la unele boli și la unii dăunători. La unele culturi în perioada calendaristică în care se organizează cultura, condițiile de temperatură nu sunt favorabile pentru apariția și înmulțirea unor dăunători periculoși, care astfel nu depășesc pragul economic de dăunare.

Posibilitatea elaborării sistemelor de protecție integrată a plantelor legumicole este determinată de folosirea relațiilor biocenotice dintre componenții agrocenozei și a mecanismelor de funcționare a lor, aplicarea metodelor biologic inofensive de combatere a dăunătorilor și bolilor folosind pragurile economice de dăunare.

Lupta biologică are drept scop principal reducerea densității numerice a populațiilor dăunătoare sub limita pragului economic de dăunare. Prin schimbarea raportului dintre dăunători și totalitatea factorilor biologicii care contribuie la reducerea sau limitarea populației dăunătorului, se contribuie la stabilirea unui nou nivel de echilibru biocenotic.

Controlul dăunătorilor și bolilor din exploatațiile legumicole se poate face prin măsuri preventive și măsuri curative.

Dintre **măsurile preventive** amintim:

- ✓ alegerea corespunzătoare a locului de cultură;
- ✓ folosirea de semințe selecționate din cultivaruri rezistente sau tolerante la atacul bolilor și dăunătorilor;
- ✓ ameliorarea solului, structură, textură, humus, pH, activitate biologică;

- ✓ alegerea corespunzătoare a epocii de înființare a culturii (semănat sau plantat);
- ✓ respectarea asolamentului stabilit;
- ✓ asocierea favorabilă a culturilor;
- ✓ practicarea rotației corespunzătoare a culturilor;
- ✓ fertilizarea echilibrată;
- ✓ aplicarea corectă a lucrărilor de întreținere;
- ✓ controlul buruienilor;
- ✓ igienă fitosanitară;
- ✓ cunoașterea faunei utile și protejarea acesteia;
- ✓ recoltarea la momentul optim.

Dintre **metodele curative** menționăm:

Mijloacele fizico – mecanice de combatere care constau în:

- ✓ îndepărtarea părților din plante atacate (defolierea la tomate, tăierea lăstarilor atacați);
- ✓ adunarea fructelor atacate de boli și dăunători;
- ✓ mulcirea la speciile la care partea comestibilă vine în contact cu solul;
- ✓ îndepărtarea păduchilor de frunze folosind un jet de apă rece sau apă caldă la 45°C;
- ✓ instalarea de capcane cleioase, de culoare galbenă împotriva muștei morcovului și a musculiței albe;
- ✓ instalații pentru culesul mecanic al gândacilor de Colorado;
- ✓ tratarea solului cu aburi în sere;
- ✓ atragerea limacșilor în capcane cu bere și distrugerea lor;
- ✓ sterilizarea masculilor cu ajutorul radiațiilor;
- ✓ distrugerea virușilor prin termoterapie;
- ✓ folosirea materialelor abrazive, cum ar fi: pleava, zgura, acele de conifere, cenușa, rumegușul, ca bariere mecanice în calea limacșilor;
- ✓ folosirea plaselor de protecție sau a foliilor Agryl împotriva dăunătorilor;

Mijloace biotehnice de combatere:

- ✓ **confecționarea de capcane biologice** din părți de plante (fructe, frunze, flori, tuberculi) și instalarea lor în grădină pentru a atrage dăunătorii, zilnic se adună aceste capcane și se ard împreună cu dăunătorii adunați;
- ✓ **instalarea de capcane cu feromoni;**
- ✓ **folosirea de material biologic liber de viroze**, obținut prin culturi de țesuturi (microtuberculi la cartof).

Mijloace biologice de combatere:

- ✓ **semănarea sau plantarea unor specii de „plante sanitar"**, care pot îndepărta sau reduce atacul unor boli și dăunători (de exemplu hreanul - are acțiune

repelentă împotriva gândacului din Colorado; menta – îndepărtează puricii de pământ şi albinița; salvia – ține la distanță albinița şi musca morcovului; isopul – îndepărtează melcii; gălbenelele şi crăițele - secretă în sol substanțe care îndepărtează nematozii; țelina – maschează mirosul de varză şi o protejează de atacul albiniței. Plantele sanitar se pot folosi ca plante premergătoare, în culturi asociate sau în benzi intercalate cu plantele legumicole.

✓ **introducerea în agrobiocenozele legumicole a faunei utile,** care să apere culturile de dăunători (unii viermi, melci, miriapozi, crustacee, păianjeni, insecte utile), unele animale vertebrate (broaştele, aricii, liliecii, cârtițele) şi de asemenea, păsările, toate având un rol important în protejarea grădinilor de legume.

✓ **folosirea faunei utile de crescătorie** – este o metodă de combatere foarte eficientă dar destul de costisitoare.

Tabelul 14.10

Specii de insecte şi nematozi utilizate în legumicultura biologică

Specia	Dăunători combătuți
Cryptolaemus montrouzierii	Păduchi cenuşii şi lânoşi – în sere
Crysopa carnea	Păduchi de frunze – în sere
Encarsia formosa	Musculița albă de seră
Dacnusa sibirica	Musca minieră
Ambliseius cucumeris	Tripsul plantelor de seră
Phitoseiulus persimilis	Acarieni din seră

Mijloace microbiologice de combatere, constau în stropiri cu preparate obținute din microorganisme vii, viruşi, bacterii sau ciuperci care parazitează sau distrug anumiți dăunători ai legumelor. Dintre aceste preparate mai cunoscute sunt preparatele virale – Virin EKS, utilizat în combaterea buhai verzei; preparatele bacteriene – Thuringin şi Dipel şi preparatele micotice care conțin ciupercile Beauvaria, Entomophtora şi Verticilliu, împotriva Gândacului din Colorado.

Mijloace fitofarmaceutice naturale, sunt foarte uşor de obținut în gospodărie, dar la utilizarea acestora trebuie respectate câteva reguli:

✓ mai întâi se folosesc preparatele care protejează plantele, apoi cele care îndepărtează dăunătorii şi în final cele care omoară;

✓ stropirile se fac imediat ce se constată apariția bolii sau a dăunătorilor, iar dacă după stropire plouă tratamentul se repetă;

✓ durata de păstrare a preparatelor este scurtă, nu se vor face cantități mari ci strict cele necesare pentru tratament.

Extractele– sunt preparate obținute prin mărunțirea unor parți din plante care se pun în vase de sticlă, lemn sau plastic şi peste care se adaugă apă rece. Extracția durează 12-24 de ore, timp în care conținutul din vas se amestecă de câteva ori.

Extractul de urzică se obține dintr-un kilogram de urzici proaspete la care se adaugă 10 litri de apă. Preparatul se poate folosi după 12 ore pentru combaterea păduchilor de frunze având acțiune repelentă.

Extractul de frunze de tomate pentru care se folosesc aproximativ 250 g de frunze la 2 litri de apă. Extractul se poate folosi după două ore pentru îndepărtarea albiniței (fluturii nu mai depun ouă pe varza stropită).

Extractul din rădăcini de hrean se prepară din 100 g rădăcini rase la 1 litru de apă, se folosește pentru tratarea semințelor.

Extractul de usturoi – 100 g de usturoi tăiat mărunt la care se adaugă 1 litru de apă, se folosește pentru tratarea semințelor în scopul prevenirii atacului de bacterioze.

Infuzii **(ceaiuri)** care se prepară din material vegetal proaspăt sau uscat, bine mărunțit peste care se toarnă apă fiartă, se folosește după răcire.

Infuzia de vetrice – 300 de grame de plantă (frunze și flori) la care se adaugă 10 litri de apă. Se folosește în concentrație de 25%, împotriva păduchilor de frunză, muștei morcovului și cepei, viermilor de sol.

Infuzie din frunze de mușețel – 10 g flori uscate la care se adaugă 200 ml de apă, se diluează apoi cu apă 1:1 și se folosește pentru tratarea semințelor și a răsadurilor.

Decocturi (fierturi) – materialul vegetal se pune în apă timp de 24 de ore după care se fierbe 30 de minute, se răcește și se filtrează.

Decoct de coada calului – 1 kg de plantă proaspătă la care se adaugă 10 litri de apă, se lasă la înmuiat 24 de ore, apoi se fierbe 30 de minute. Se folosește în concentrație de 20% pentru stropirea solului la 14 zile, prevenind apariția ciupercilor.

Decoct de pelin – 300 de grame de plante verzi se pun in 10 litri de apă și se fierbe timp de 25 de minute. Se folosește împotriva albiniței.

Decoct de frunze de nuc – 100 g frunze de nuc la care se adaugă 10 litri de apă, după 24 de ore se fierbe amestecul 10 minute. Se folosește pentru a alunga șoarecii de câmp.

Plămădeli, care se obțin prin introducerea materialului vegetal mărunțit în butoaie mari de lemn sau plastic, care se țin în locuri însorite, aerisite și ferite de precipitații. Se pune apă în butoi, dar se lasă un spațiu de 20 de cm până la gura butoiului (pentru adunarea spumei de fermentare), butoiul se acoperă cu scânduri. Zilnic se amestecă conținutul butoiului, după 2-3 săptămâni când nu se mai formează spumă se filtrează și se folosește zeama.

Plămădeală din frunze de revent – 2 kg de frunze proaspete la care se adaugă 10 litri de apă, se utilizează în concentrație de 50%, pentru combaterea păduchilor de frunze.

Plămădeală de pelin – 300 grame de plantă proaspătă, se adaugă 10 litri de apă, se folosește pentru combaterea păduchilor de frunze.

Plămădeală de urzică – 1 kg de plante proaspete la care se adaugă 10 litri de apă, se folosește în concentrație de 2%, în combaterea păduchilor de frunze și acarienilor.

Tabelul 14.11

Substanțe folosite în legumicultura biologică

Denumirea	Utilizare
Cupru sub formă de hidroxid de cupru, oxiclorură de cupru, sulfat de cupru (tribazic), oxid cupros	Fungicid
Sare de potasiu a acizilor grași (săpun moale)	Insecticid
Apa de sticlă (silicat de sodiu sau potasiu)	Combaterea gândacului de Colorado
Polisulfura de calciu	Fungicid, insecticid, acaricid
Ulei de parafina	Insecticid, acaricid
Permanganat de potasiu	Fungicid, bactericid
Nisip de cuarț	Agent de respingere
Sulf	Fungicid, acaricid, agent de respingere

O stare fitosanitară bună a culturilor ecologice de legume poate fi asigurată și indirect, prin anumite lucrări de îngrijire, aplicate într-un mod specific.

Astfel, la unele specii (tomate), udarea prin aspersiune care ridică umiditatea atmosferică la valori mari, creează condiții favorabile pentru apariția și instalarea unor boli ale aparatului foliar. Aceste atacuri îl determină pe cultivator să intervină prin tratamente fitosanitare sau să renunțe la acestea, acceptând o stare fitosanitară necorespunzătoare care are drept consecință realizarea unor producții mici și de calitate inferioară, dacă nu poate iriga pe rigole sau prin picurare.

La alte specii (ardei), plantele atacate de viroze care constituie surse de infecție, trebuie smulse și eliminate din cultură. Dacă rămân, aceste plante înțepate de afide vor contribui la extinderea virozelor care determină pe termen mediu infestarea unui număr foarte mare de plante, ceea ce înseamnă de fapt compromiterea parțială sau chiar totală a culturii.

În culturile din sere unde se aplică curent combaterea biologică a unor dăunători, atunci când se fac lucrări de copilit sau defoliere, materialul vegetal detașat de pe plantă se lasă în strat subțire pe terenul mulcit cu folie de polietilenă timp de două zile. În acest interval de timp prădătorii migrează pe părțile viabile ale plantelor în căutarea insectelor dăunătoare.

În spațiile închise – sere, solarii – destinate culturilor forțate și protejate, se recomandă interzicerea accesului tuturor celor care nu lucrează pentru înființarea, întreținerea și recoltarea culturilor ecologice.

Dintre celelalte lucrări de îngrijire care se aplică și în culturile ecologice, mai importante și cu un specific mai pronunțat sunt următoarele:

Palisarea. Conducerea plantelor cu talie înaltă pe verticală, pe spalier sau araci are o importanță tehnologică deosebită pentru efectuarea în condiții optime a unor lucrări de îngrijire cum sunt tratamentele fitosanitare, prașilele și udările. Efectuarea cu acuratețe a acestor lucrări contribuie direct la asigurarea unei stări fitosanitare și fiziologice foarte bune, cu implicații pozitive asupra nivelului și calității producției.

Defolierea bazei plantelor la culturi palisate de tomate se efectuează pentru eliminarea frunzelor atacate, debile şi a celor îmbătrânite. Această lucrare contribuie direct la menținerea în cultură a unor plante viguroase, care sunt atacate mai târziu de agenții patogeni.

Polenizarea suplimentară se realizează prin scuturarea plantelor, prin vibrarea inflorescențelor folosind dispozitive portabile acționate de baterii sau prin utilizarea unor jeturi de aer pulsatorii create de aparatură portabilă acționată electric.

În țările cu tehnologie agricolă avansată polenizarea suplimentară a tomatelor, ardeiului şi vinetelor în sere este realizată în exclusivitate cu ajutorul bondarilor. Stupii cu familii de bondari sunt produşi şi distribuiți de firme specializate. Zburând de la temperaturi de 6^0C, bondarii vizitează şi polenizează toate florile, asigurând în acest fel fructificarea completă pe toate inflorescențele plantelor de tomate.

Polenizare cu bondari este aplicată în sere şi solarii şi în țara noastră în ultimii ani. Pentru evitarea pierderii bondarilor solariile trebuie să fie acoperite cu folii de protecție care să împiedice zborul insectelor polenizatoare.

Recoltarea, condiționarea, păstrarea şi comercializarea produselor biologice

Recoltarea produselor biologice se face respectând în principiu aceleaşi reguli ca la recoltarea legumelor din sistemele convenționale de cultură. Pentru recoltare se va avea în vedere stabilirea momentului optim pentru începerea lucrării în funcție de destinația ulterioară a producției, când părțile comestibile ale plantelor au ajuns la mărimea, culoarea şi însuşirile caracteristice fiecărei specii şi soi.

Recoltarea se face pe vreme uscată şi răcoroasă, evitându-se perioadele foarte calde ale zilei şi vremea umedă.

Lucrarea se poate executa manual, mecanizat sau semimecanizat în funcție de dotarea tehnică a fermei şi de destinația producției.

O atenție deosebită se va acorda condiționării ulterioare a produselor ținând cont şi de destinația producției. Astfel, producția destinată comercializării se va sorta după formă, mărime culoare în aşa fel încât în acelaşi lot de produse acestea să aibă aproximativ aceleaşi caracteristici.

Spălarea produselor sau perierea acestora se va executa la speciile la care partea comestibilă se formează în sol (rădăcinoase, bulboase), doar dacă operațiunea este absolut necesară, de obicei, se evită acest lucru deoarece părțile comestibile vor fi mult mai uşor supuse deshidratării iar dacă uscarea nu se face foarte bine se pot instala ciuperci care duc la deprecierea produselor, mai ales la cele care se depozitează în vrac. Pentru spălare se consumă cantități mari de apă, iar eliminarea apelor uzate poate fi foarte dificilă.

Fasonatul constă în îndepărtarea frunzelor la rădăcinoase (morcov, pătrunjel, păstârnac), fasonatul trebuie să se realizeze odată cu recoltatul pentru a preveni deshidratarea produsului. Frunzele exterioare veştede la salată, varză, spanac se îndepărtează imediat după recoltare. Ridichile de lună se vor comercializa fără a li se îndepărta frunzele.

Ambalarea legumelor se face în ambalaje care trebuie să fie rezistente, să permită circulația aerului prin masa produsului, să permită paletizarea şi să fie uşor de mânuit.

Marketingul produsului biologic

Pentru ca o fermă biologică să poată fi rentabilă, deci să aibă o situaţie financiară care să îi permită obţinerea unor venituri importante şi care să faciliteze continuarea producerii şi în următorii ani în sistemul agriculturii biologice, este necesară găsirea pieţei de desfacere încă din stadiul de planificare a culturilor. La nivel international piaţa este organizată şi bine structurată.

Produsele ecologice sunt cotate la bursele internationale agricole cu preţuri superioare celor conventionale. Cererea de produse ecologice este în continuă creştere atât din punct de vedere cantitativ cât şi calitativ.

Lărgirea gamei de produse ecologice prin abordarea unor culturi "netradiţionale" (culturi de broccoli, varză de Bruxelles, ridichi de lună, andive, varză chinezească, etc) ar putea reprezenta de asemenea, un pas important în legumicultura biologică.

O problemă importantă este aceea de stabilire a preţului produselor biologice. În Uniunea Europeană produsele ecologice sunt mai scumpe cu 5–25 % deci se poate spune că produsele ecologice se adresează doar unei categorii de clienţi, singura capabilă să plătească preţurile mari cerute de către producători.

O politică a preţurilor joase ar avea ca şi consecinţă mărirea cu mult a clientelei produselor ecologice. Dar, datorită cheltuielilor de producţie mai ridicate din fermele biologice, costuri legate în primul rând de mâna de lucru utilizată şi de producţiile ceva mai mici realizate, deoarece nu se folosesc îngrăşămintele chimice şi produsele pentru tratamente fitosanitare e normal ca preţul produsului obţinut să fie mai mare.

Comercializarea pe piata internă necesită un efort continuu de promovare a conceptului "ecologic" cât şi a produselor, care deocamdată sunt insuficient cunoscute dată fiind slaba informare a consumatorilor.

Pentru a mări rentabilitatea fermelor biologice este necesară asocierea producătorilor, ceea ce va conduce la obţinerea partidelor mari de produse aceasta fiind singura soluţie viabilă pentru realizarea unor comercializări la export.

Produsele agroalimentare ecologice vor fi exportate însoţite de certificatul de control în original, emis de un organism de inspecţie şi certificare acreditat în România în conformitate cu legislaţia în vigoare din acest domeniu.

Etichetarea produselor ecologice se face în conformitate cu reglementările legale în vigoare. Pe etichete se va indica: numele şi adresa producătorului; denumirea produsului, metoda de producţie ecologică utilizată; numele şi marca organismului de inspecţie şi certificare; condiţiile de păstrare; termenul minim de valabilitate;

Etichetele vor cuprinde o siglă specifică produselor biologice controlate, înregistrată la Oficiul de Stat pentru Invenţii şi Mărci, emisă şi aplicată pe baza sistemului de certificare, pe care se va indica că produsul respectiv este conform cu regulile de producţie ecologică.

În cazul în care produsele biologice se păstrează pentru o perioadă mai lungă de timp se interzice depozitarea în acelaşi spaţiu cu produse obţinute prin tehnici convenţionale.

15. TOXICOLOGIA ÎN BIOTEHNOLOGII

INTRODUCERE

Ştiinţele vieţii, printre care şi biotehnologia, ca ştiinţă de graniţă, influenţează într-o foarte mare măsură, turnover-ul economic global, având implicaţii asupra unor ramuri de activitate importante, precum: alimentaţia, resursele energetice, sănătatea, agricultura, silvicultura etc, cu atât mai mult cu cât, biotehnologia deschide noi modalităţi de procesare a materiilor prime. Biotehnologia ca ştiinţă a viitorului, se implică în industrie, agricultură, medicină umană şi veterinară, zootehnie, oferind soluţii alternative şi eficiente (*Smith, J.,E., 1996, Biotechnology, Cambridge University Press*).

În acest context, ramurile biotehnologice se pot subclasifica în **biotehnologii agricole** (vegetale, zootehnice), **biotehnologii industriale** (farmaceutice, alimentare, depoluante), **biotehnologii medicale şi medical-veterinare** (medicamente, alcaloizi) etc. Procesele biotehnologice şi tehnologiile dezvoltate special pentru aceste ramuri, pot fi considerate mai puţin poluante, comparativ cu o serie de tehnologii "clasice". Totuşi, există **factori de risc toxicologic**, ce nu trebuie subapreciaţi, având în vedere că produsele biotehnologice, în marea lor majoritate, se adresează consumului uman şi animal.

În concordanţă cu ramurile biotehnologice amintite mai sus, vom explora în cele ce urmează aspecte legate de toxicologia factorilor de risc a unor domenii de activitate. Abordăm în consecinţă, aspecte ale **toxicologiei biotehnologice agricole**, ale **toxicologiei biotehnologice industriale**, ale **toxicologiei biotehnologice medicale şi medical-veterinare**, cu implicaţii la **nivel molecular**, precum şi mecanismele exprimării toxicităţii. Domeniile amintite se întrepătrund, având în vedere că produse biotehnologice agricole, spre exemplu, devin materii prime pentru biotehnologia industrială. Se vor evidenţia anumite capitole ale **toxicologiei biotehnologice** mai puţin explorate în volumul I al "Tratatului de Biotehnologie", precum: efectele toxice ale pesticidelor, ale unor substanţe mutagene, ale alcaloizilor, aspectele toxicologice şi toxicogenetice ale consumului de medicamente, modalităţile de biotransformare a toxicelor proprii organismelor etc.

Modalităţile de biotransformare a toxicelor, prin resurse proprii organismelor, respectiv prin acţiunea unor enzime, se pot îndrepta în două direcţii: în sensul inactivării toxicelor (detoxifiere) şi în sensul bioactivării toxicelor (obţinerea unui compus mai toxic decât cel iniţial). Detoxifierea se realizează la aproape toate nivelurile, dar organ principal de detoxifiere rămâne ficatul, cu sistemul enzimatic microzomal. Reacţiile de biotransformare metabolică a toxicelor se clasifică în:

- reacţii din faza I, anume – oxidare, reducere, hidroliză;
- reacţii din faza a-II-a, anume – conjugare.

Conjugarea este un mecanism prin care un compus propriu organismului se cuplează sau se conjugă cu toxicul respectiv. În funcţie de substanţa endogenă care participă la cuplare, conjugarea poate fi: glucuronoconjugare, sulfoconjugare, aminoconjugare, conjugare mercapturică, conjugare tiocianică etc. Importanţa conjugării rezidă în faptul că, de obicei, produşii rezultaţi nu sunt toxici şi pot fi eliminaţi cu uşurinţă prin urină sau fecale. Datorită importanţei deosebite a biotransformărilor metabolice, în studiul de faţă sunt evidenţiate o serie de reacţii biochimice suferite de diferite clase de substanţe toxice.

Toxicologia trebuie reevaluată şi revalorizată în acest moment, din perspectiva noilor concepte privind siguranţa consumatorilor, concepte bazate pe principiul prevenirii potenţialelor riscuri toxicologice, care sunt subliniate în sistemele moderne de management al calităţii (HACCP).

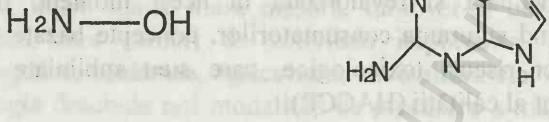
15.1. NOŢIUNI DE TOXICOLOGIE BIOTEHNOLOGICĂ MOLECULARĂ

15.1.1. Agenţi toxici mutageni şi carcinogeni

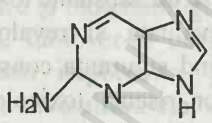
Se ştie că orice toxic natural are un substrat genetic, fiind rezultatul metabolismului celular, controlat de mecanisme ereditare. Interrelaţiile toxicologiei cu genetica sunt prin urmare, suficient de complexe pentru a justifica un capitol independent în această expunere. Putem vorbi în principiu, de o **toxicologie a geneticii naturale**, legată de fenomenele nonantropice care se petrec în natură şi care este supusă mecanismelor variabilităţii naturale (cazul ciupercilor sau a unor plante, care deşi păstrează fenotipul comun, comestibil, devin toxice), de o **toxicologie a ingineriei genetice** sau a **geneticii dirijate**, care presupune apariţia efectelor toxice ca urmare a intervenţiei omului în mecanismele variabilităţii, precum şi de o **toxicologie dinamică a geneticii**, care studiază modul în care o serie de substanţe exogene acţionează la nivel genetic.

În această parte a lucrării ne vom referi cu precădere la ultimele două categorii de toxicologie, acestea fiind legate în mod direct de sfera de interes a biotehnologiei. Caracteristica de universalitate a codului genetic, face ca activitatea toxicelor să se desfăşoare prin mecanisme similare, indiferent de treapta filogenetică pe care se află organismul afectat. Ţoxicii genetici pot fi socotiţi prin urmare, "toxici universali". Ei acţionează în mod direct asupra moleculelor de acizi nucleici, determinând schimbări ale secvenţelor de nucleotide, sau modificări în structura nucleotidelor, prin eliminarea sau adiţionarea unor grupări chimice la nivelul bazelor azotate. Modificările pe care toxicii genetici le provoacă sunt cunoscute sub numele de **mutaţii**, iar mecanismul prin care se produc aceste modificări se numeşte **mutageneză**.

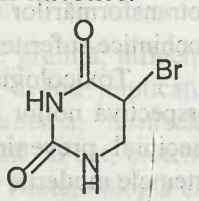
Cei mai cunoscuţi mutageni sunt: acidul azotos, hidroxilamina, agenţii alchilanţi (etil-metan-sulfonatul şi metil-metan-sulfonatul), o serie de analogi ai bazelor azotate (5-bromuracilul, 2-aminopurina, 5-bromodeoxiuridina), compuşi nitrozaminici (N-etil-N-nitrozo-ureea), precum şi o serie de toxine micotice.



Hidroxilamina



2 – Aminopurina



5 – Bromuracil

Acidul azotos, hidroxilamina şi analogii bazelor azotate produc "mutaţii punctiforme", caracterizate prin faptul că sunt localizate la nivelul unei singure perechi de nucleotide.

În tabelul următor sunt prezentate mecanismele prin care substanţele de mai sus produc tranziţia perechilor de baze AT şi GC în GC respectiv AT.

Tabelul 15.1

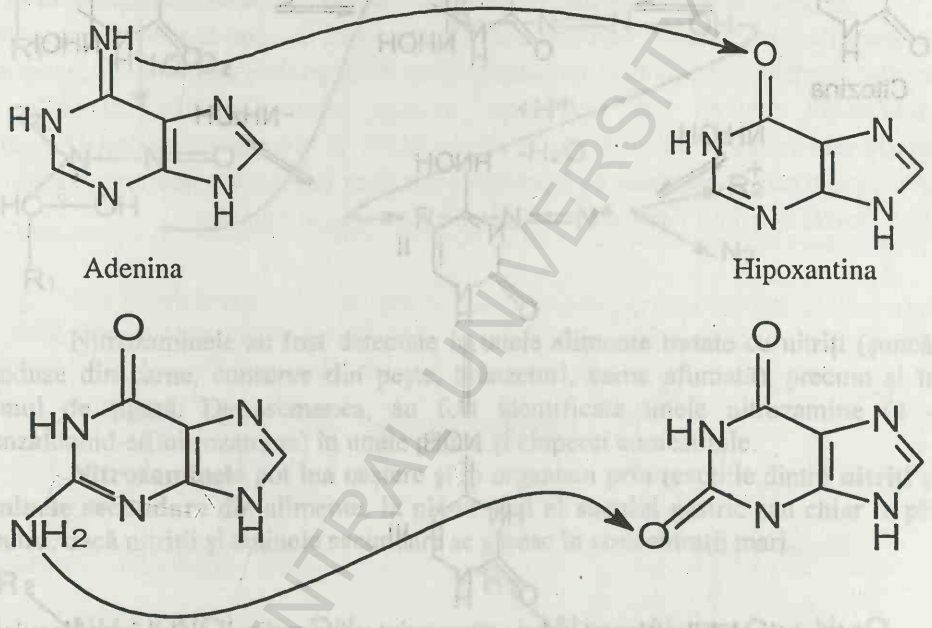
Mecanismele activităţii mutagenice a unor substanţe

PERECHE INIŢIALĂ DE BAZE	MUTAGEN	SECVENTA DE REACŢII	PERECHE FINALĂ DE BAZE
A-T	5 – Bromuracil (B)	A-B→G-B	G-C
G-C		G-B→A-B	A-T
A-T	2 – Aminopurina (AP)	AP-T→AP-C	G-C
G-C		AP-C→AP-T	A-T
A-T	Acid azotos	I-T→I-C	G-C
G-C		X-U→A-U	A-T
G-C	Hidroxilamina	G-C_X→A-C_X	A-T

Afinitatea acestor compuşi, pentru tranziţiile între perechile de baze din tabelul 15.1, se datorează în cazul **5-bromuracilului** spre exemplu, capacităţii sale de a forma perechi de baze în forma cetonică, cu Adenina, iar în forma enolică, cu Guanina.

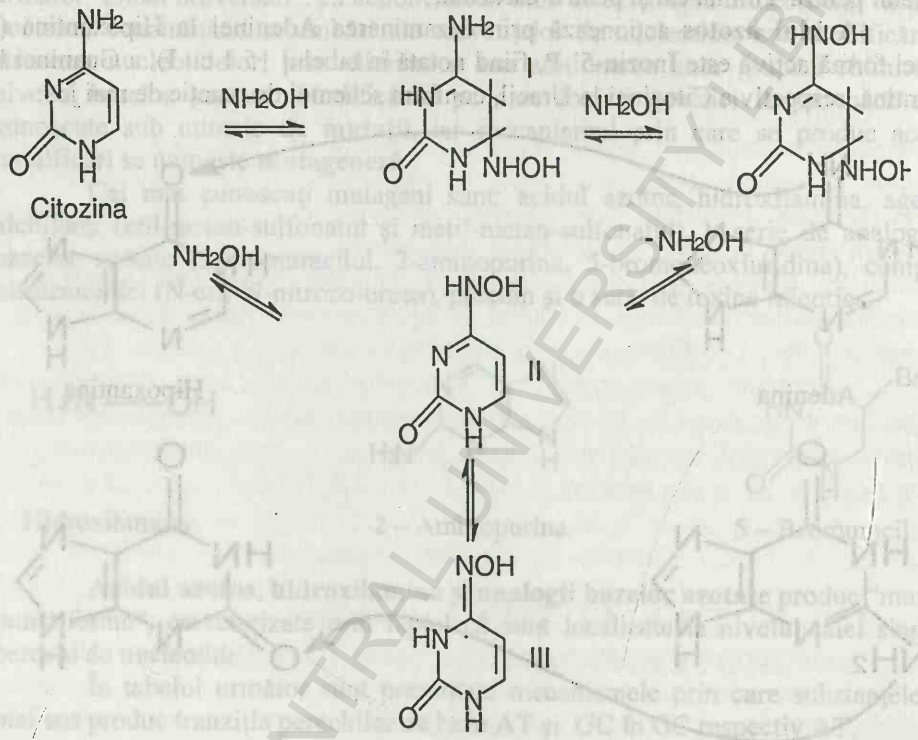
Acţiunea mutagenă a **2-aminopurinei** decurge de asemenea, din afinitatea sa, atât pentru Timină cât şi pentru Citozină.

Acidul azotos acţionează prin dezaminarea Adeninei la Hipoxantină (a cărei formă activă este Inozin-5'-P, fiind notată în tabelul 15.1 cu **I**), a Guaninei la Xantină, respectiv a Citozinei la Uracil, conform schemei de reacţie de mai jos:



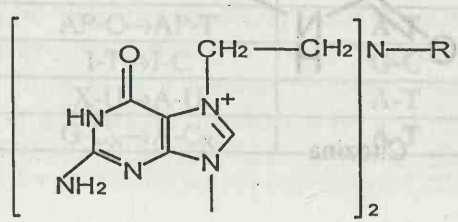
BUAS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Hidroxilamina determină tranziția perechii de baze GC în perechea AT, pe baza convertirii grupărilor -NH_2 ale citozinei în grupări –NHOH. Produșii formați devin astfel capabili de a lega Adenina. Nu se cunoaște cu certitudine care dintre cei trei compuși din secvența de reacții de mai jos (I, II, III), este responsabil de activitatea mutagenică a hidroxilaminei.

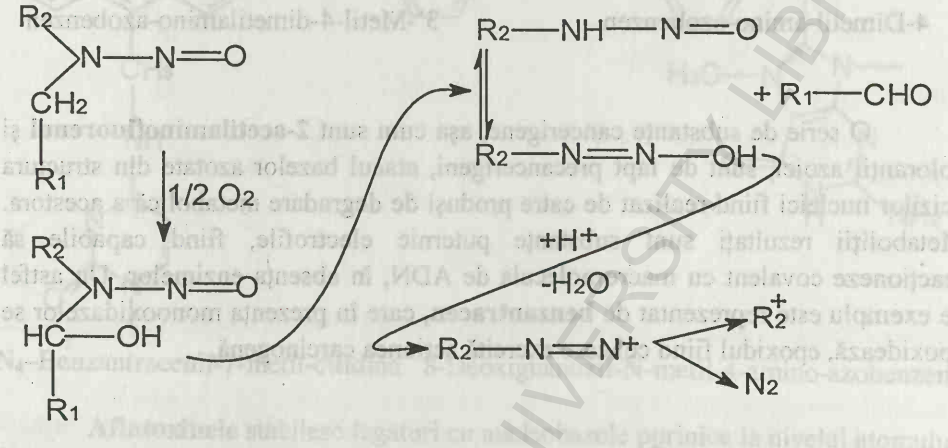


Agenții alchilanți sunt substanțe care introduc radicali alchil în moleculele compușilor activi biologic, determinând modificarea structurii, comportamentului chimic și a funcțiilor acestora. Acizii nucleici, în special ADN-ul conține o serie de grupări nucleofile capabile să lege covalent agenții alchilanți, cu efecte asupra procesului de duplicare a materialului genetic. Bazele azotate din macromolecula de ADN prezintă atomi de N cu reactivitate diferită față de agenții alchilanți. Ordinea descrescătoare a reactivității acestora este: N_7 din guanină, N_3 din adenină și N_1 din adenină, respectiv citozină. 7-Alchil-guaninele și 3-alchil-adeninele se pot desprinde ușor din molecula de ADN, prin ruperea legăturii nucleozidice, determinând degradarea macromoleculei. Totodată, a fost identificat un dimer al 7-alchil guaninei.

Dimer de 7-alchil guanină

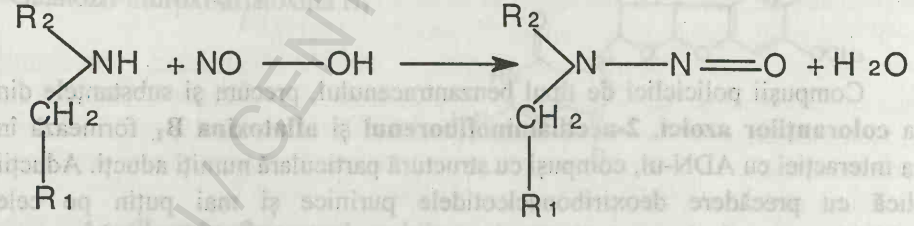


O serie de compuşi, deşi nu au în mod direct acţiune alchilantă, au ca produşi de degradare radicali alchil. Astfel, o serie de **nitrozamine**, precum dimetil-nitrozamina, a determinat apariţia în acizii nucleici ai animalelor tratate, a 7-metilguaninei. Mecanismul prin care nitrozaminele sunt degradate la radicali alchil este prezentat mai jos:



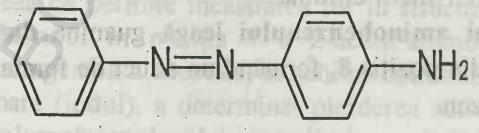
Nitrozaminele au fost detectate în unele alimente tratate cu nitriţi (şuncă, produse din carne, conserve din peşte, brânzeturi, carne afumată), precum şi în fumul de ţigară. De asemenea, au fost identificate unele nitrozamine (4 – benzaldehid-etilnitrozamina) în unele plante şi ciuperci comestibile.

Nitrozaminele pot lua naştere şi în organism prin reacţiile dintre **nitriţi** şi **aminele secundare** din alimente, la pH-ul acid al sucului gastric sau chiar la pH neutru, dacă nitriţii şi aminele secundare se găsesc în concentraţii mari.

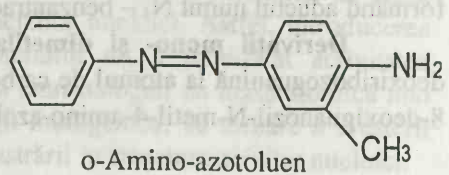


Amină secundară Acid azotos Nitrozamină

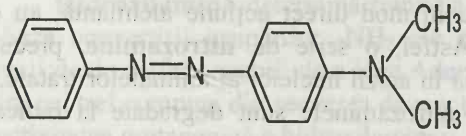
O serie de derivaţi ai **azobenzenului** (sau **azotoluenului**), folosiţi în industria alimentară în calitate de coloranţi (coloranţi aminoazoici), prezintă de asemenea, un potenţial major de risc, fiind capabili să producă alterări ale mesajului genetic:



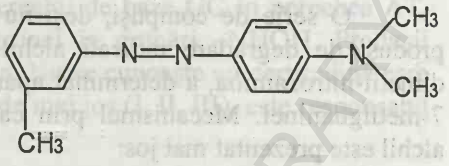
4-Amino-azobenzen



o-Amino-azotoluen

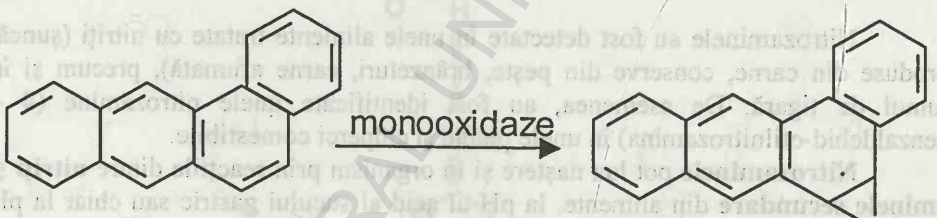


4-Dimetil-amino-azobenzen



3'-Metil-4-dimetilamino-azobenzen

O serie de substanţe cancerigene, aşa cum sunt **2-acetilaminofluorenul** şi coloranţii azoici, sunt de fapt precancerigeni, atacul bazelor azotate din structura acizilor nucleici fiind realizat de catre produşi de degradare metabolică a acestora. Metaboliţii rezultaţi sunt substanţe puternic electrofile, fiind capabile să reacţioneze covalent cu macromolecula de ADN, în absenţa enzimelor. Un astfel de exemplu este reprezentat de **benzantracen,** care în prezenţa monooxidazelor se epoxidează, epoxidul fiind cel care exercită acţiunea carcinogenă.



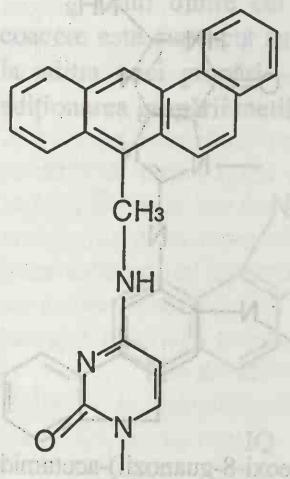
Benzantracen Benzantracen-epoxid

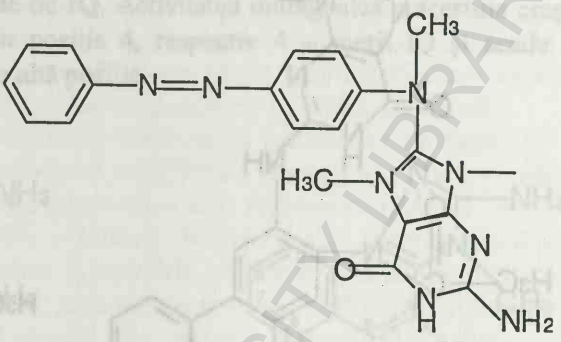
Compuşii policiclici de tipul benzantracenului, precum şi substanţele din clasa **coloranţilor azoici, 2-acetilaminofluorenul** şi **aflatoxina B_1,** formează în urma interacţiei cu ADN-ul, compuşi cu structură particulară numiţi aducţi. Aducţii implică cu precădere deoxiribonucleotidele purinice şi mai puţin pe cele pirimidinice.

Dintre compuşii policiclici cei mai răspândiţi, menţionăm: benzpirenul, 7-metil-benzantracenul, 7,12-dimetil-benzantracenul, precum şi 20-metil-colantrenul, sau 1,2-benzfenantrenul.

Benzantracenul se leagă la atomul de azot, din pozitia 4, al citidinei, formând aductul numit N_4 – benzantracenil-7-metil-citidina.

Derivaţii mono- şi dimetilat ai aminobenzenului leagă guanina din deoxiribozoguanină la atomul de carbon din poziţia 8, formând un aduct de forma 8-deoxiguanozil-N-metil-4-amino-azobenzen.

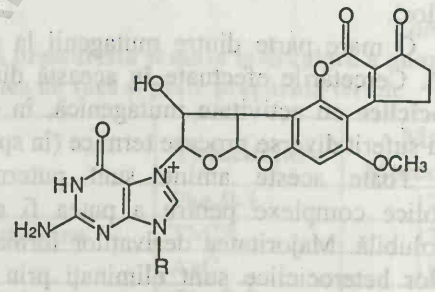




N_4–Benzantracenil-7-metil-citidina 8-Deoxiguanozil-N-metil-4-amino-azobenzen

Aflatoxinele stabilesc legături cu nucleobazele purinice la nivelul atomului de azot N_7, determinând modificarea conformației macromoleculei de ADN. Aductul format de aflatoxina B_1 este de forma 7-guanozil-hidroxi-aflatoxina B_1.

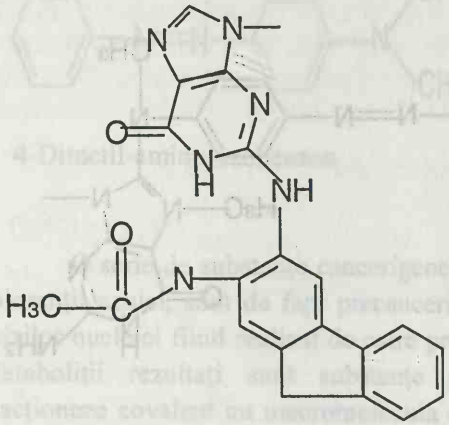
7-Guanozil-hidroxi-aflatoxina B_1



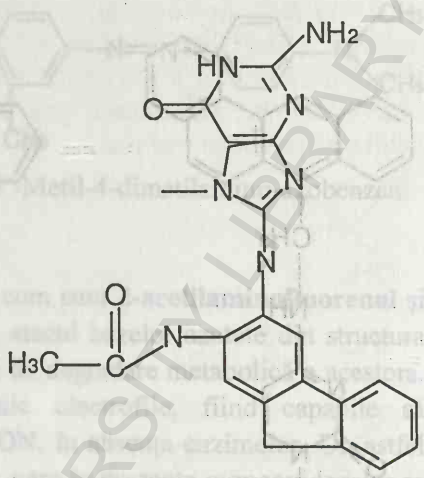
Acetil-aminofluorenul stabilește legături cu nucleobazele purinice la nivelul grupării aminice sau la nivelul ciclului aromatic, pe care gruparea aminică este inserată, formând aducți de tipul: acetamido-3-2'-deoxi-N_2-guanozil fluoren sau 3-N-(2'-deoxi-8-guanozil)-acetamido-fluoren.

Acțiunea carcinogenă a acestor compuși este influențată de volumul moleculei, mutagenii cei mai activi având dimensiuni similare perechilor de baze, ceea ce permite încastrarea lor în structura acizilor nucleici. Astfel, introducerea fluorului în poziția 7 a 2-acetil-aminofluorenului nu a modificat activitatea mutagenică a acestuia, în schimb introducerea unui halogen cu masă atomică mai mare (iodul), a determinat pierderea activității mutagenice, ca urmare a creșterii volumului moleculei, peste limita posibilă încastrării în structura acizilor nucleici.

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Acetamido-3-(2'-deoxi-N_2-guanozil) fluoren



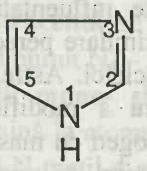
3-N-(2'-deoxi-8-guanozil)-acetamido fluoren

Destabilizarea conformațională și structurală a ADN, în urma formării aducților, are repercusiuni asupra transmiterii mesajului genetic (conținut în secvența nucleotidelor) și implicit asupra succesiunii proceselor de replicare-transcripție-translație. Acțiunea acestor substanțe pregătesc declanșarea proceselor teratogene (determină malformații fetale) și oncogene (determină apariția tumorilor).

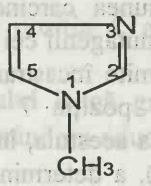
O mare parte dintre mutagenii la care suntem expuși provine din dieta noastră. Cercetările efectuate în această direcție au identificat mai multe **amine heterociclice** cu activitate mutagenică, în cele mai comune produse alimentare, care au suferit diverse procese termice (în special coacere).

Toate aceste amine sunt puternic lipofile, necesitând transformări metabolice complexe pentru a putea fi eliminate din organism, într-o formă hidrosolubilă. Majoritatea derivaților formați la nivelul catabolismului celular al aminelor heterociclice sunt eliminați prin urină, însă o parte dintre aceștia au reactivitate sporită, legând ADN-ul și provocând boli genetice.

Invariantul comun, pentru toate aminele heterociclice implicate, este **ciclul imidazolic**. Activitatea mutagenică este strâns legată de prezența grupării metil $-CH_3$ pe ciclul imidazolic, suferind modificări în funcție de poziția exactă a grupării pe ciclu, precum și în funcție de prezența altor grupări $-CH_3$ în alte poziții.

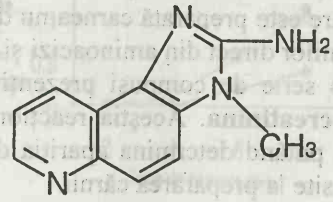


Ciclu imidazolic

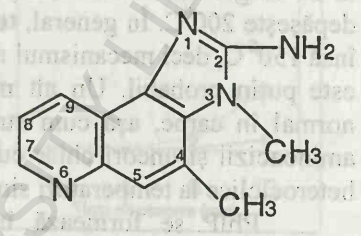


Ciclu imidazolic metilat

Unul dintre cei mai cunoscuți mutageni din alimentele preparate prin coacere este cunoscut sub numele de **IQ**. Activitatea mutagenică a acestuia crește la adiția unei grupări – CH_3 în poziția 4, respectiv 4 – metil IQ și scade la adiționarea grupării metil în orice altă poziție.



IQ



4 – metil IQ

În tabelul 15.2 sunt prezentate 14 substanțe identificate în carnea de vacă și pește, tratată termic. Activitatea mutagenică a acestora diferă de la specie la specie, același agent mutagen putând determina în cazul unei specii, apariția cancerului de colon, în timp ce la alte specii este implicat în cancerul hepatic.

Tabelul 15.2

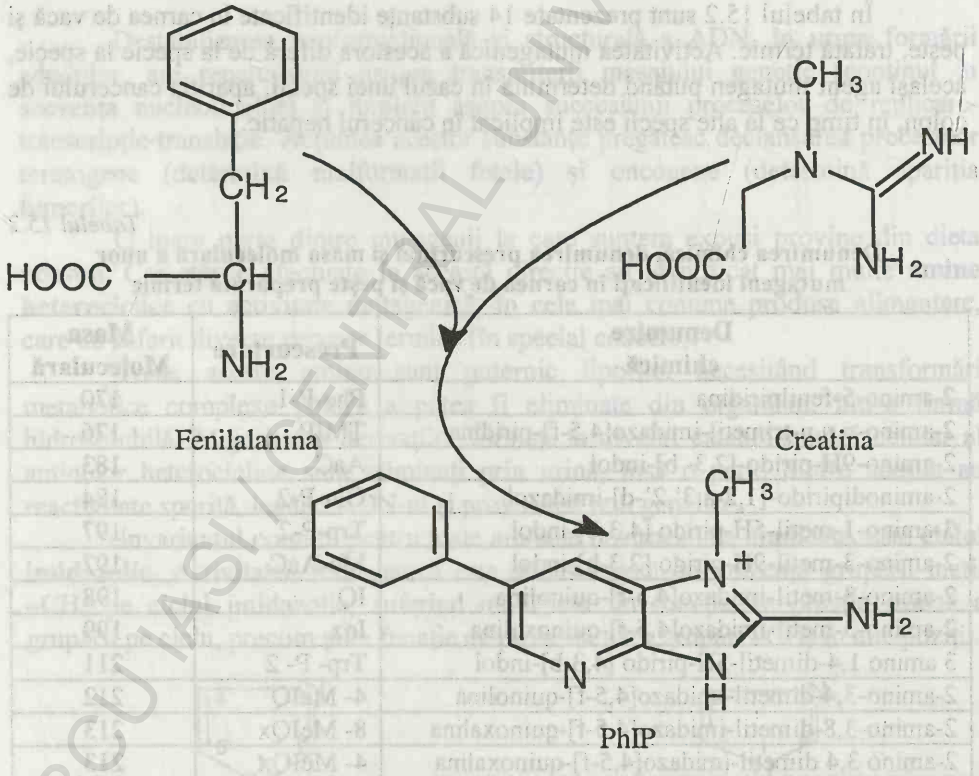
Denumirea chimică, denumirea prescurtată și masa moleculară a unor mutageni identificați în carnea de vacă și pește preparată termic

Denumire chimică	Prescurtare	Masa Moleculară
2-amino-5-fenilpiridina	Phe-P-1	170
2-amino-n,n,n-trimetil-imidazo[4,5-f]-piridina	TMIP	176
2-amino-9H-pirido-[2,3- b]-indol	AaC	183
2-aminodipirido-[1,2-a:3',2'-d]-imidazol	Glu-P-2	184
3-amino-1-metil-5H-pirido [4,3-b]-indol	Trp-P-2	197
2-amino-3-metil-9H-pirido [2,3-b]-indol	Me-AaC	197
2-amino-3-metil-imidazo[4,5-f]-quinolina	IQ	198
2-amino-3-metil-imidazo[4,5-f]-quinoxalina	Iqx	199
3 amino 1,4-dimetil-5H-pirido [4,3-b]-indol	Trp- P- 2	211
2-amino-3,4-dimetil-imidazo[4,5-f]-quinolina	4- MeIQ	212
2-amino-3,8-dimetil-imidazo[4,5-f]-quinoxalina	8- MeIQx	213
2-amino 3,4 dimetil-imidazo[4,5-f]-quinoxalina	4- MeIQx	213
2-amino-1-metil-6-fenil-imidazo[4,5- b]-piridina	PhIP	224
2-amino-3,4,8 trimetil-imidazo[4,5-f]-quinoxalina	4,8- DiMeIQx	227

Se apreciază ca în comparaţie cu benz-[α]pirenul, care este un carcinogen comun, larg răspândit (conţinut în fumul de motor, fumul de ţigară, fumul rezultat la arderea lipidelor), PhIP este de 10 ori mai mutagen. IQ este de 100 de ori mai mutagen decât PhIP, iar 4- MeIQ este de 3 ori mai nociv decât IQ.

Se admite faptul că aminele heterociclice pot apărea în alimente pornind de la un singur aminoacid sau proteină, în condiţiile în care temperatura de coacere depăşeşte 200^{0}C. În general, temperatura la care este preparată carnea nu depăşeşte însă 150^0 C, deci mecanismul apariţiei mutagenilor direct din aminoacizi şi proteine este puţin probabil. Un alt model implică o serie de compuşi prezenţi în mod normal în carne, aşa cum sunt **creatina** şi **creatinina**. Aceştia reacţionează cu aminoacizii şi uneori chiar cu unele glucide, putând determina apariţia de amine heterociclice la temperaturi similare celor folosite la prepararea cărnii.

PhIP se formează în urma reacţiei dintre L-fenilalanină şi creatină, conform mecanismului prezentat mai jos, estimându-se că mutagenul IQ poate apărea în urma unor mecanisme care pleacă de la creatină, creatinină şi 4 aminoacizi diferiţi.



Rata apariţiei mutagenilor în carnea de vacă preparată este dependentă de timpul de coacere şi temperatura la care are loc procesul. De asemenea, rata de acumulare este dependentă de natura agentului mutagen format, aşa cum se observă în figura 15.1.

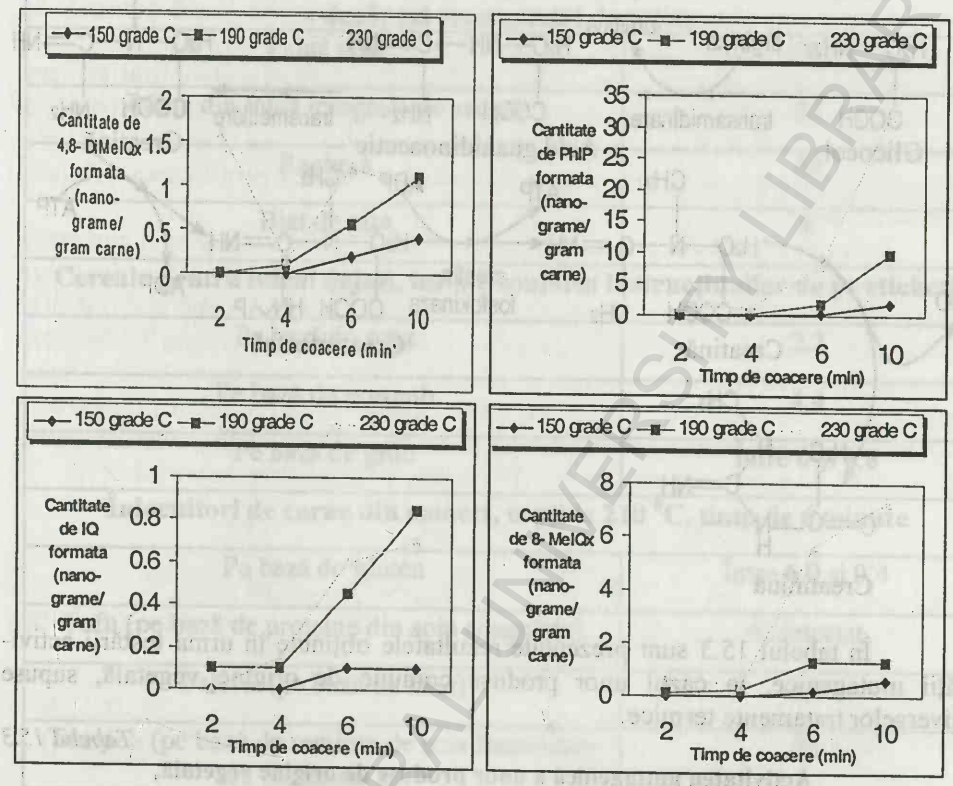
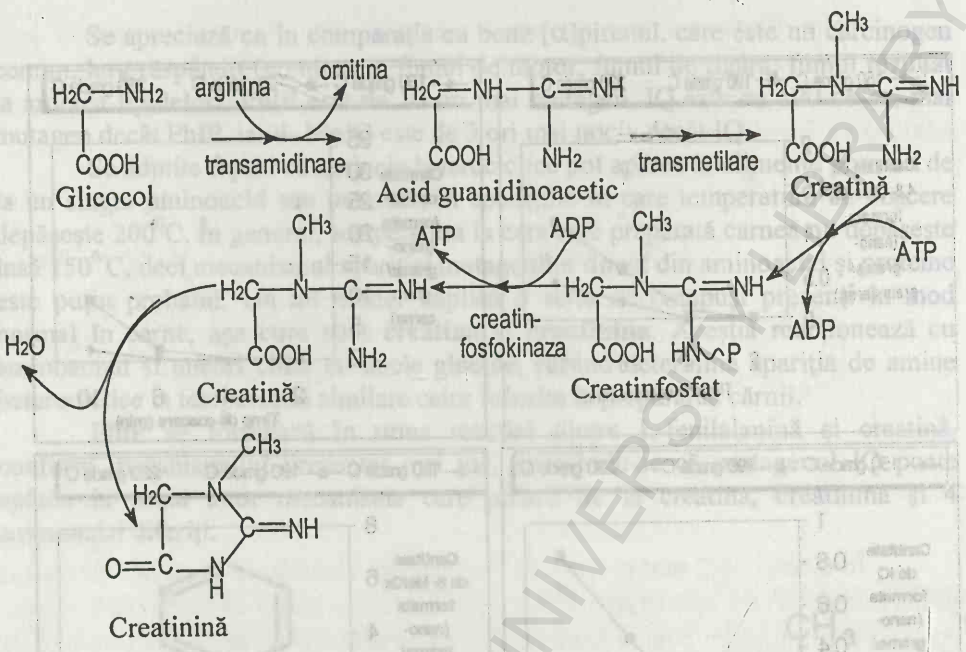


Figura 15. 1. Conținutul de IQ, 8-MeIQx, 4,8-DiMeQx și PhIP al cărnii de vacă, preparate în diferite condiții de temperatură și la timpi diferiți

Procesele de tratare termică a alimentelor sunt larg răspândite în industria alimentară, motiv pentru care și în cazul unor produse de origine vegetală tratate termic, s-a suspectat existența unui potențial mutagenic, similar celui pe care-l are carnea coaptă. Lipsa creatinei și creatininei din unele produsele vegetale, precum: glutenul, făinurile diverselor cereale sau pâinea, face ca posibilitatea apariției agenților mutageni de genul PhIP sau IQ să fie puțin probabilă. Totuși, o serie de cercetări investighează în prezent, posibilitatea ca unii aminoacizi precum arginina, să joace în hrana de origine vegetală, rolul de precursori pe care-l au creatina și creatinina, în hrana de origine animală.

Implicarea argininei în procesele mutagenice din hrana de origine vegetală, pare a fi totuși susținută de observarea unor mecanisme metabolice care implică atât creatina, creatinina, cât și arginina, în ficatul, rinichii și pancreasul animalelor. La aceste nivele, creatina și creatinina se obțin sub acțiunea transamidinazelor și a transmetilazelor, enzime ce folosesc ca substrat arginina. Rămâne de dovedit însă existența unui mecanism similar și în cazul produselor de origine vegetală.



În tabelul 15.3 sunt prezentate rezultatele obținute în urma testării activității mutagenice, în cazul unor produse comune de origine vegetală, supuse diverselor tratamente termice.

Tabelul 15.3

Activitatea mutagenică a unor produse de origine vegetală, determinată pe baza testului Ames/Salmonella

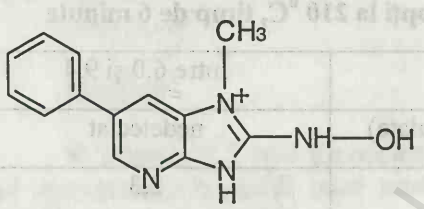
PRODUS	Activitate mutagenică (număr de mutageni per gram)
Făinuri din cereale, încălzite la 210 ^{0}C, timp de 60 de minute	
Gluten – de calitate chimică	1330
Gluten – de calitate alimentară	970
Făină de porumb	180
Făină de garbanzo	1890
Făină de orez	Nedetectat
Făină de secară	Nedetectat
Făină albă de grâu pentru pâine	320
Probe de produse alimentare coapte conform instrucțiunilor din rețete	
Paine albă	2
Pâine din făină integrală de secară	6
Baghetă	6
Blat de pița	3
Biscuiți graham	4
Băuturi din cereale	320

Probe de produse alimentare coapte un timp de două ori mai mare decât cel recomandat de rețete	
Paine albă	5
Pâine din făină integrală de secară	28
Baghetă	40
Blat de pița	8
Cereale pentru micul dejun, testate conform instrucțiunilor de pe etichetă	
Pe bază de orez	2,2
Pe bază de porumb	4,4
Pe bază de grâu	Între 0 și 8,8
Înlocuitori de carne din comerț, copți la 210 ^{0}C, timp de 6 minute	
Pa bază de gluten	Între 6,0 și 9,4
Tofu (pe bază de proteine din soia coagulate)	nedetectat
Falafel (pe bază de năut)	2,3
Tempeh (pe bază de semințe de soia fermentate cu Rhizopus sp.)	23
Burgeri din Tofu	nedetectat
Pe bază de soia	6,6
Pe bază de gluten (copt la 230 ^{0}C)	30
Produse de referință de origine animală	
Hamburgheri copți la 210 ^{0}C, timp de 6 minute	220
Hamburgheri copți la 230 ^{0}C, timp de 6 minute	800
Hamburgheri copți la 250 ^{0}C, timp de 6 minute	1400

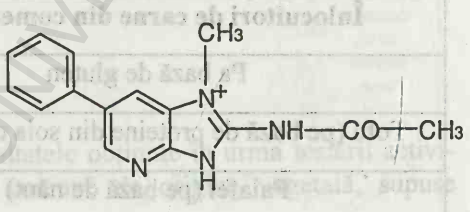
Așa cum se observă din tabel, activitatea mutagenică identificată în unele produse vegetale tratate termic, tinde să crească pe măsura creșterii temperaturii și a timpului de expunere. Deși în general, activitatea mutagenică nu atinge valorile pe care le are carnea coaptă, putem observa valori similare ale acesteia în unele produse cum sunt: glutenul, făina de porumb, făina de garbanzo, făina albă din grâu pentru pâine și băuturile pe bază de cereale.

Cheia procesului de mutageneză este reprezentată de **fenomenul de bioactivare** a premutagenului în organism. Premutagenul din hrană pătrunde în organism prin ingestie, supravieţuieşte barierei reprezentate de aciditatea stomacală şi ajunge în intestin, de unde este preluat de fluxul sanguin şi metabolizat în ficat. Bioactivarea hepatică presupune degradarea premutagenului la compuşi capabili să interfereze cu ADN-ul, formând aducţi. Aceşti aducţi determină erori de replicare a ADN şi funcţionarea anormală a genelor care controlează proliferarea celulară, provocând cancer.

În celulele ficatului şi a altor organe, a fost identificat complexul enzimatic numit Citocrom P 450 S, implicat în bioactivarea acestor mutageni. Bioactivarea se realizează prin catalizarea transformării precursorului într-o substanţă mai polară şi implicit mai reactivă. De exemplu, enzima P 450 IA 2, converteşte PhIP într-o moleculă intermediară, care conţine o grupare – OH (N- hidroxi PhIP). Acest compus, poate forma aducţi cu ADN-ul, însă afinitatea pentru astfel de procese este totuşi redusă. Dar N- hidroxi PhIP, este transformat mai departe prin acetilare la N-acetoxi PhIP, compus care are faţă de ADN o reactivitate foarte puternică.



N-hidroxi PhIP



N- acetoxi PhIP

Acest tip de intermediari poate fi transportat de la ficat şi la alte organe, provocând injurii biochimice ale ADN la nivelul altor ţesuturi şi în perspectivă, proliferări celulare anormale.

După cum se ştie, oamenii prezintă predispoziţii diferite pentru apariţia şi dezvoltarea tumorilor. Aceste predispoziţii sunt determinate genetic şi se referă la capacitatea mecanismelor metabolice de a bioactiva sau bioinactiva o substanţă străină pătrunsă în corp. Există însă mecanisme de reparare a ADN-ului aducţionat cu diverşi compuşi. Aceste mecanisme sunt la rândul lor determinate genetic şi sunt caracterizate de o specificitate înaltă, implicând un echipament complex de proteine şi enzime (peste 30).

Mecanismul de reparare implică următoarele secvenţe:

- recunoaşterea defecţiunii materialului genetic;
- tăierea porţiunii defecte de o parte şi de alta a defecţiunii, în poziţii strict determinate;
- sinteza unui nou material genetic, într-o direcţie predeterminată, astfel încât se produce un petic reparator;
- legarea peticului reparator în locul secvenţei tăiate (figura 15.2).

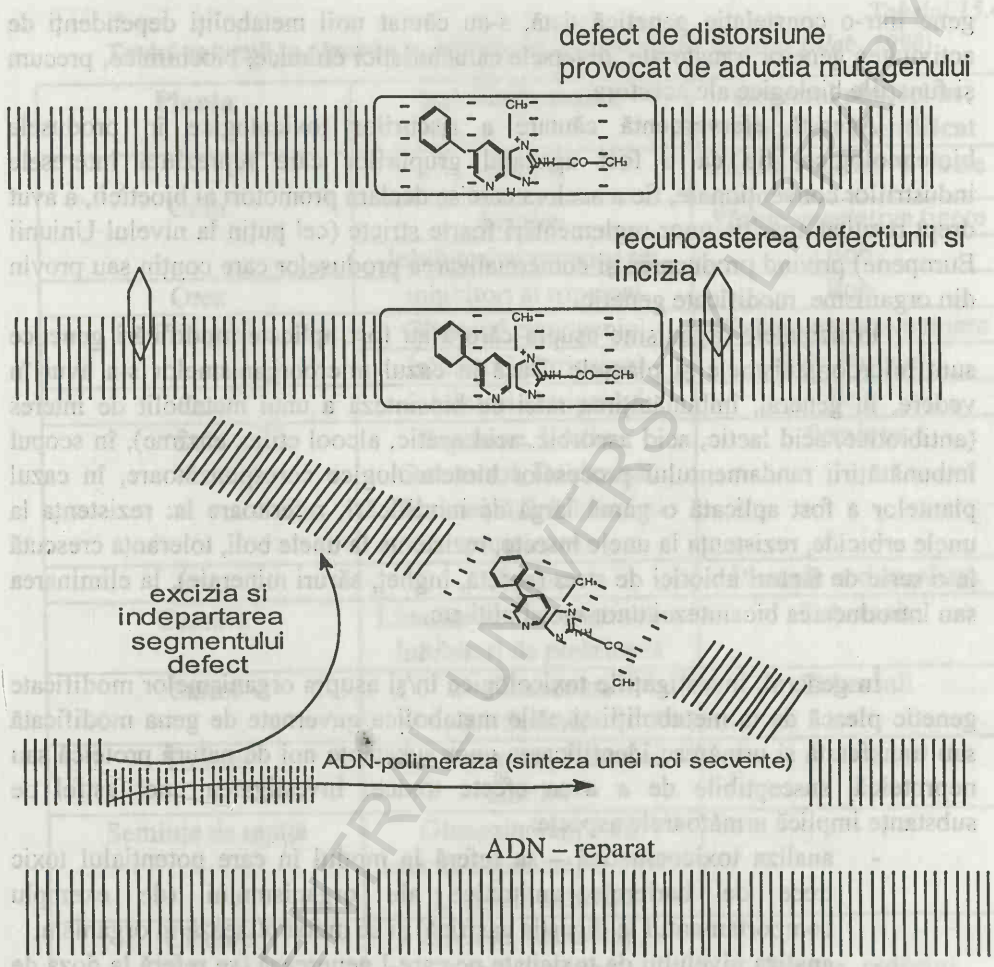


Figura 15. 2. Mecanismul de reparare a ADN-ului aducţionat cu diverşi compuşi

Mutaţiile apar atunci când: fie mecanismele de reparare a materialului genetic nu funcţionează, fie când acestea funcţionează defectuos, generând erori de sinteză a peticului, sau ligări nepotrivite ale acestuia.

15.1.2. Toxicologia organismelor modificate genetic

Realizările recente ale biotehnologiei, au determinat la nivelul opiniei publice mondiale, nenumărate controverse, legate de evaluarea potenţialului toxigen al produselor biotehnologice, controverse ce tind să devină o problemă a specialiştilor implicaţi direct sau indirect în această activitate. Au fost efectuate studii asupra metabolismului organismelor modificate genetic (OMG), au fost analizate aspectele alergogene pe care le implică transferul interspecific al unei

gene într-o constelație genetică dată, s-au căutat noii metaboliți dependenți de activitatea genelor transferate, diversele caracteristici chimice, biochimice, precum și funcțiile biologice ale acestora.

Această efervescentă căutare a riscurilor toxicologice în produsele biotehnologice, fie că a fost apanajul grupurilor care reprezintă interesele industriilor convenționale, fie a acelora care se declară promotori ai bioeticii, a avut drept rezultat apariția unor reglementări foarte stricte (cel puțin la nivelul Uniunii Europene) privind producerea și comercializarea produselor care conțin sau provin din organisme modificate genetic.

Principalele organisme asupra cărora au fost aplicate modificări genetice sunt microorganismele și plantele. Dacă în cazul microorganismelor s-a avut în vedere, în general, îmbunătățirea ratei de biosinteză a unui metabolit de interes (antibiotice, acid lactic, acid ascorbic, acid acetic, alcool etilic, enzime), în scopul îmbunătățirii randamentului proceselor biotehnologice corespunzătoare, în cazul plantelor a fost aplicată o gamă largă de modificări, referitoare la: rezistența la unele erbicide, rezistența la unele insecte, rezistența la unele boli, toleranța crescută la o serie de factori abiotici de stres (secetă, îngheț, săruri minerale), la eliminarea sau introducerea biosintezei unor metaboliți etc.

În general, investigațiile toxicologice în/și asupra organismelor modificate genetic pleacă de la metaboliții și căile metabolice guvernate de gena modificată sau transferată și urmăresc identificarea unor substanțe noi de natură proteică sau neproteică, susceptibile de a avea efecte toxice. Investigarea unei astfel de substanțe implică următoarele aspecte:

- analiza toxicocinetică – se referă la modul în care potențialul toxic trece de barierele antitoxice ale organismului (de exemplu comportamentul la digestia gastrică) și se metabolizează în organism;
- analiza nivelului de toxicitate pe care-l generează (se referă la doza de substanță necesară pentru a genera un răspuns toxic din partea organismului);
- analiza alergogenității (analiza reacției imunitare a organismului);
- analiza genotoxicității (analiza potențialului mutagen sau carcinogen).

Suspiciunile toxicologice asupra organismelor modificate genetic, pleacă de la informațiile acumulate în ceea ce privește substratul asupra căruia acționează ingineria genetică și anume diversele produse de natură biologică utilizate în alimentația omului. Observarea și identificarea unor toxici în plantele comestibile, substrat pentru ingineria genetică, face ca suspiciunea față de plantele modificate genetic să fie și mai mare. În tabelul 15.4 sunt prezentați principalii toxici identificați în diverse produse vegetale, precum și organele plantei în care aceștia se regăsesc.

Tabelul 15.4

Toxici naturali în plantele nemodificate genetic *(după Holm şi colab. 1998)*

Planta	Substanţa toxică	Organul plantei în care a fost identificat
Grâu	Durina	Părţile vegetative tinere
	Lectine	Părţile vegetative tinere
	Inhibitori ai proteinazei	Bob
Orez	Inhibitori ai tripsinei	Bob
Porumb	Glicozizi cianogenici	Părţile vegetative tinere
	Inhibitori ai tripsinei	Bob, Panicul
Orz	Inhibitori ai tripsinei	Bob
Soia	Saponine, Lectine, Cumestrol, Daidzeină, Genisteină, Inhibitori ai proteinazei	Seminţe
Sorg	Durina	Plantele nedezvoltate
Cassava	Linamarina, Lotaustralina, Inhibitori de proteinază	Tuberculi
Cartof	α – Chaconina α – Solanina	Tuberculi
Tomate	α – Tomatina, Nicotina, Lectine	-
Seminţe de rapiţă	Glucozinolaţi, Acid erucic, Saponine, S-metil-L-cistein sulfoxid	-
Cicoare	Lectine, Lactucina, Lactucopicrina, 8-Deoxilactucina	Frunze, rădăcini

În general, studiul modificărilor chimice apărute în structura plantelor modificate genetic, au urmărit valorile anumitor indici (tabelul 15.5) referitori la: compoziţia în aminoacizi (AA), compoziţia în acizi graşi ciclopropenoidici (CP), în acid erucic (EA), în total acizi graşi (FA), glicoalcaloizi (GA), glucozinolaţi (GL), gosipol (GP), izoflavone (IF), lectine (LE), substanţe minerale (MI), micotoxine (MT), acid fitic (PA), proteine (PR), precum şi la evaluarea unor parametrii chimici de interes general: conţinut de proteină, conţinut de lipide, conţinut de cenuşă, conţinut de fibre, conţinut de umiditate, conţinut de glucide (PX), conţinut în rafinoză (SR), conţinut în zaharuri (SU), în tocoferoli (TF), în tripsin-inhibitor (TI), în urează (UR), în α – tomatină (TO) şi în vitamine (VI).

Tabelul 15.5

Parametrii testați, în vederea investigării potențialului toxigen, a unor plante modificate genetic (*după Harry A. Kuiper și colab., 2001, The Plant Journal*)

Planta modificată	Modificare	Parametrii testați	Autori
Rapiță	Creștera cantității de acid lauric	AA, EA, FA, GL	Radenbaugh și colab. (1995)
Rapiță GT73	Rezistența la erbicide (glifosat)	AA, EA, FA, GL, MI, PA, PX,	ANZFA (2000)
Bumbac 1445	Rezistența la erbicide (glifosat)	AA, FA, GT, MT, PX, TF	Nida și colab. (1996)
Bumbac	Rezistența la erbicide (bromoxinil)	AA, CP, FA, GP	Radenbaugh și colab. (1995)
Porumb GA21	Rezistența la erbicide (glifosat)	AA, FA, MI, PX	Sidhu și colab. (2000)
Porumb	Rezistența la erbicide (glufosinati)	AA, FA, PX, SU	Bőhme și Aurlich (1999)
Porumb	Rezistența la insecte (Cry1Ab)	AA, FA, MI, PX	Sanders și colab. (1998)
Porumb	Rezistența la insecte (Cry1Ab)	MT, PX	Masoero și colab. (1999)
Porumb Bt176	Rezistența la insecte (Cry1Ab)	AA, MT, PX	Brake și Vlachos (1998)
Porumb Bt176	Rezistența la insecte (Cry1Ab)	AA, FA, MI, PX, SU	Aurlich și colab. (1999)
Porumb MON810	Rezistența la insecte (Cry1Ab)	AA, FA, MI, PA, PX, SU, TF, TI	ANZFA (2000)
Cartof	Rezistența la erbicide (clorsulfuron)	AA, PX	Conner (1994)
Cartof	Rezistența la insecte (Cry3A)	GA, MI, PX, VI	Lavrik și al. (1995)
Orez	Gena pentru glicinină din soia	AA, FA, MI, PX, VI	Momma și al. (1999)
Soia GTS 40-3-2	Rezisistența la erbicide (glifosat)	AA, FA, IF, LE, PX, SR, TI, UR	Padgette și colab. (1996)
Soia GTS 40-3-2	Rezisistența la erbicide (glifosat)	IF	Lappé și colab. (1999)

Soia	Creşterea conţinutului in acid oleic	AA, FA, IF, MI, PA, PX, SR, TI, VI	ANZFA (2000)
Cucurbitaceae	Rezistenţa la virusuri (ZYMV, WMV2)	MI, PX, SU, VI	Quemada (1996)
Sfecla de zahăr	Rezisistenţa la erbicide (glufosinati)	PX	Bőhme şi Aurlich (1999)
Tomate	Rezistenţa la insecte (Cry1Ab)	AA, MI, PX, VI, TO	Noteborn şi colab. (1995)
Tomate (Flavr Savr)	Coacerea modificată (gena pentru poligalacturonaza antisens)	MI, PR, VI, TO	Redenbaugh şi colab. (1991)

Rezistenţa la erbicide este determinată fie de amplificarea producţiei în plantă a enzimei asupra căreia acţionează erbicidul, fie de apariţia unei enzime mutante, rezistente la acţiunea erbicidului, fie pur şi simplu de sinteza unor noi enzime, capabile să metabolizeze erbicidul (enzime de detoxifiere). Glifosatul acţionează asupra enzimei 5-enol-piruvilshikmat-3-fosfat-sintetaza (EPSPS), implicată în căile metabolice ale biosintezei aminoacizilor aromatici esenţiali.

Apariţia rezistenţei la glifosat a fost posibilă în urma transferului genei pentru EPSPS de la petunie (caz în care s-a obţinut creşterea rezistenţei la glifosat, ca urmare a creşterii activităţii enzimatice a EPSPS în plantele transgenice), respectiv în urma transferului unor gene bacteriene mutante, care permit sintetizarea unei forme a EPSPS rezistente la acţiunea erbicidului.

O altă direcţie de evoluţie a mecanismelor de control a rezistenţei la erbicide, este cea a transferului la plante, a unor gene codificatoare pentru enzime de detoxifiere. Au fost obţinute astfel, plante de tutun, tomate, cartof, bumbac şi lucernă, rezistente la următoarele erbicide: Bromoxinil (având ca enzimă de detoxifiere nitrilaza), Fosfinotricin (acetil-transferaza), Atrazin (glutation-S-transferaza).

Rezistenţa la viroze are ca fundament, transferul la plantele sensibile, a genelor care codifică proteina virală (capsida) şi obţinerea ARN antisens.

În cazul tomatelor cu coacere modificată, manipulările genetice au urmărit reducerea nivelului exprimării genelor pentru poligalacturonază, enzimă implicată în procesul de coacere. Acest lucru a fost realizat pe baza introducerii în plante a unei clone antisens, a genei pentru poligalacturonază. Plantele obţinute astfel, sunt

capabile să sintetizeze un ARN_m antisens, care hibridizează specific ARN_m, pentru enzima endogenă. Se formează astfel, hibrizi dublu catenari de ARN_m, care blochează traducerea mesajului genetic pentru poligalacturonază.

Plantele transgenice rezistente la unele insecte, au fost obținute ca urmare a transferului unor gene plasmidiale, provenind de la bacteria Bacillus thuringiensis. Aceasta este o bacterie gram pozitivă, care la sporulare sintetizează o formațiune proteică numită "cristal parasporal", "cristal proteic" sau *B.t.*- delta endotoxină. Cristalul proteic se prezintă sub mai multe forme: bipiramidal, cubic, sferic sau neregulat. În cadrul grupului Bacillus thuringiensis, există trei tipuri de cristale proteice, denumite patotipuri (A, B și C). Patotipurile, sunt la rândul lor constituite din mai multe clase proteice. Astfel, clasa Cry I/patotip A, patogenă pentru lepidoptere, clasa Cry II/patotip A+B, patogenă pentru lepidoptere și diptere, clasa Cry III/patotip C, patogenă pentru coleoptere, clasa Cry IV/patotip B, patogenă pentru diptere (v. cap. Pesticide biotehnologice produse de bacterii).

Orice modificare genetică pune organismul în fața unei provocări noi. În cazul plantelor utilizate în alimentație, această nouă provocare trebuie evaluată din perspectiva riscurilor pe care noul produs genetic la presupune. Dacă în cazul aditivilor alimentari există suficiente cunoștințe în legătură cu doza zilnică acceptată, fără a exista un răspuns toxic din partea organismului, în cazul organismelor modificate genetic, această cantitate critică de produs este dificil de evaluat. Conform conceptului geneticii clasice, o genă este echivalentă cu o proteină. Prin urmare, orice modificare genetică crează, cel putin teoretic, o proteină nouă, față de care reacția sistemului imunitar este greu de anticipat, constituind astfel un risc.

Evaluarea noilor proteine sau substanțe neproteice din organismele modificate genetic, se face plecând de la un concept numit "substantial equivalence" (echivalență). Echivalența estimează potențialul toxigen al unei noi substanțe, pe baza asemănării ei structurale, conformaționale, funcționale etc., cu un toxic cunoscut. Echivalența face apel la logica similitudinilor, considerând că pe măsură ce numărul similitudinilor dintre două substanțe crește, crește și riscul ca aceste două substanțe să producă în organism o reacție similară. În figura 15.3 este prezentat un algoritm, pe baza căruia se poate face evaluarea din punct de vedere toxicologic, a unui organism modificat genetic.

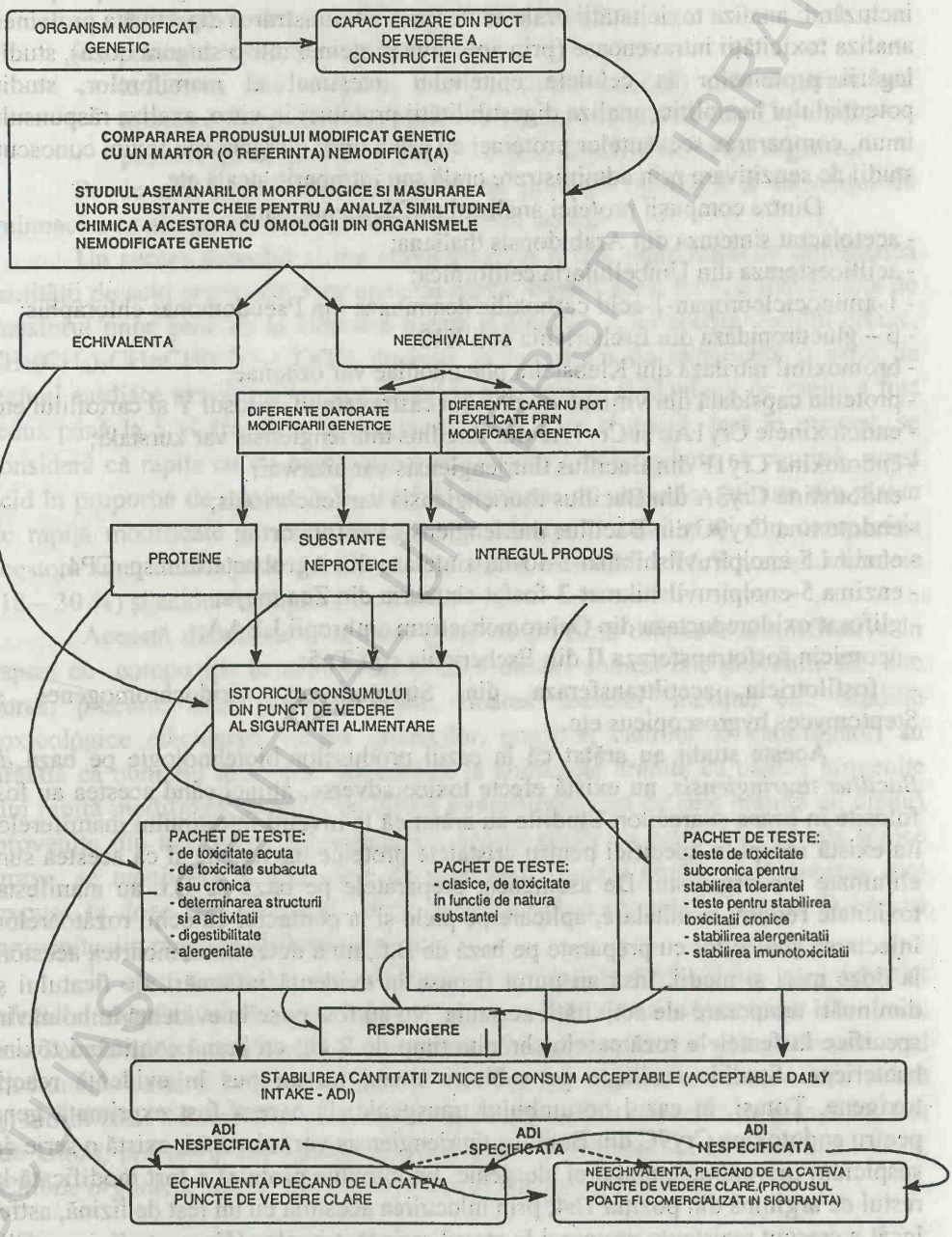


Figura 15.3. Algoritm pentru testarea riscului toxicologic al organismelor modificate genetic şi al produselor obţinute din acestea

Asupra diverşilor componenţi proteici, exprimaţi în plantele modificate genetic, au fost făcute numeroase studii de toxicitate în special pe şoareci incluzând: analiza toxicitatăţii orale acute (prin administrarea digestivă a proteinei), analiza toxicităţii intravenoase (prin aplicarea proteinei într-o singură doză), studiul legării proteinelor la celulele epiteliului intestinal al mamiferelor, studiul potenţialului hemolitic, analiza digestibilităţii proteinei in vitro, analiza răspunsului imun, compararea secvenţelor proteinei cu cea a unor alergeni sau toxici cunoscuţi, studii de senzitivare prin administrare orală sau intraperitoneală etc.

Dintre compuşii proteici analizaţi astfel, menţionăm:
- acetolactat sintetaza din Arabidopsis thaliana;
- aciltioesteraza din Umbellularia celifornica;
- 1-aminociclopropan-1-acid carboxilic deaminaza din Pseudomonas chloraphis;
- β – glucuronidaza din Escherichia coli K12;
- bromoxinil nitrilaza din Klebsiella pneumoniae var ozaenae;
- proteina capsidală din virusul mozaicului castravetelui, virusul Y al cartofului etc;
- endotoxinele Cry1Ab şi Cry1Ac din Bacillus thuriengiensis var kurstaki;
- endotoxina Cry1F din Bacillus thuriengiensis var aizawai;
- endotoxina Cry3A din Bacillus thuriengiensis var tenebrionis;
- endotoxina Cry9C din Bacillus thuriengiensis var tolworthi;
- enzima 5-enolpiruvilshikmat-3-fosfat-sintetaza din Agrobacterium sp. CP4;
- enzima 5-enolpiruvilshikmat-3-fosfat-sintetaza din Zea mays;
- glifosat oxidoreductaza din Ochromobactrum anthropii LBAA;
- neomicin fosfotransferaza II din Escherichia coli Tn5;
- fosfilotricin acetiltransferaza din Streptomyces viridochromogenes şi Steptomyces hygroscopicus etc.

Aceste studii au arătat că în cazul produselor biotehnologie pe bază *de Bacillus thuringiensis*, nu există efecte toxice adverse, atunci când acestea au fost folosite în hrana şoarecilor. Studiile au arătat că la nivelul intestinului mamiferelor nu există receptori specifici pentru cristalele proteice bacteriene şi că acestea sunt eliminate din organism. De asemenea, preparatele pe bază de B.t. au manifestat toxicitate redusă, la inhalare, aplicare pe piele şi la contactul cu ochii rozătoarelor. Injectarea şoarecilor cu preparate pe bază de B.t., nu a determinat moartea acestora la doze mici şi medii, însă au putut fi puse în evidenţă inflamări ale ficatului şi diminuări temporare ale activităţii acestuia. Nu au fost puse în evidenţă îmbolnăviri specifice la femelele rozătoarelor hrănite timp de 2 ani cu hrană conţinând toxine bacteriene. Studiile realizate pe subiecţi umani nu au pus în evidenţă reacţii toxigene. Totuşi, în cazul porumbului transgenic, la care a fost exprimată gena pentru endotoxina Cry9C din Bacillus thuriengiensis var tolworthi, există o serie de suspiciuni privind potenţialul ei alergenic. Endotoxina proteică a fost modificată la restul de arginină din poziţia 164, prin înlocuirea acestuia cu un rest de lizină, astfel încât a crescut rezistenţa proteinei la atacul serinproteazelor (*Harry A. Kuiper, Gijs A.Kleter, Hub P. J. M. Noteborn, Esther J. Kok, 2001, Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods, The plant Journal, 27 (6), 503 – 528*).

În plus, endotoxina astfel modificată, prezintă o serie de similitudini cu o serie de alergeni cunoscuți, anume:

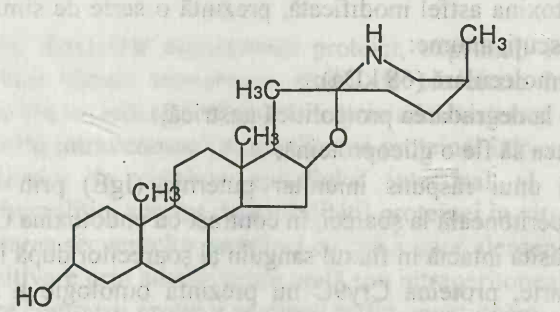
- greutatea moleculară (68 kDa);
- rezistența la degradarea proteolitică gastrică;
- posibilitatea să fie o glicoproteină;
- inducerea unui răspuns imunitar puternic (IgE) prin ingerare sau injectare peritoneală la șoareci, în contrast cu endotoxina Cry1Ab5;
- poate fi găsită intactă în fluxul sanguin al șoarecilor după ingerare.

Pe de altă parte, proteina Cry9C nu prezintă omologie a secvenței de aminoacizi cu alergeni cunoscuți sau cu proteine toxice.

Un succes deosebit al ingineriei genetice a fost reprezentat de diminuarea cantității de acid erucic din semințele de rapiță. Pentru acest lucru a fost nevoie de transferul unor gene de la Brassica napus și Brassica Campestris. Acidul erucic, $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH)_{11}COOH$ provoca la animalele de experiență o serie de leziuni cardiace grave. Inițial, conținutul în acid erucic al plantelor de rapiță a fost redus până la 5 % (raportat la conținutul total în acizi grași), însă în prezent, se consideră că rapița cu un conținut scăzut de acid erucic trebuie să conțină acest acid în proporție de maxim 2 %. Studiile efectuate pe uleiurile obținute din plante de rapiță modificate genetic, au arătat că principalii acizi grași din compoziția acestora sunt: acidul palmitic (2 – 6 %), acidul oleic (50 – 66 %), acidul linoleic (18 – 30 %) și acidul linolenic (6 – 14 %).

Această distribuție a acizilor grași nu prezintă diferențe semnificative în raport cu compoziția în acizi grași ai unor uleiuri comestibile provenite din alte surse, precum: soia, porumb, alune, floarea soarelui, masline etc. Studiile toxicologice efectuatate asupra șoarecilor, porcilor, câinilor și maimuțelor, au arătată că numărul leziunilor miocardice la animalele hrănite cu uleiuri provenite din rapiță modificată genetic, nu diferă semnificativ față de cele hrănite cu uleiuri provenite din alte surse. De asemenea, aceste studii au arătat că efectele toxice grave, se manifestă la animalele de experiență, numai atunci când acestea sunt expuse la doze care transced doza anticipată de expunere a omului la uleiuri provenite din rapiță modificată genetic.

În cazul tomatelor modificate genetic, studiile toxicologice au evidențiat efectele transferului de gene asupra concentrației de α – tomatină din fruct. α – Tomatina este un glicozid toxic natural al tomatelor, care se găsește în principal în frunzele verzi și în fructele necoapte. Din aceste organe, tomatina a fost izolată și hidrolizată. S-au obținut două molecule de glucoză, o moleculă de galactoză, una de xiloză, precum și un aglicon reprezentat de tomatidină (*C. D. Nenitescu, 1974, Chimie organică, vol. II, Ed. Didactică și Pedagogică, București*).



Tomatidina

Nivelul de α – tomatină descreşte în fructul de tomate pe măsură ce acesta se maturează, de la 0,87 mg/g de fruct proaspăt la 0,45 mg/g în fructele galbene, respectiv la 0,36 mg/g în fructele roşii. Această cantitate scade rapid, după ruperea fructului copt de pe plantă. Metabolizarea tomatinei are loc în fruct, aceasta nefiind mobilă în plantă. Tomatina, spre deosebire de solanina din cartof, determină numai o inactivare minoră a acetilcolinesterazei, însă efectul său toxic este comparabil cu cel al solaninei.. Tomatina administrată digestiv la hamsteri, a determinat, apariţia unor modificări majore la nivelul mucoasei gastrice şi intestinale a acestora, similare celor produse de doze echimolare de solanină.

O serie de solanaceae sălbatice, capabile de încrucişări cu plantele de cultură, conţin gene de rezistenţă la insecte. Dintre acestea, Lycopersicon hirsutum glabratum, prezintă o cantitate de 3,39 mg de tomatină / gramul de fruct proaspăt, adică de aproape patru ori mai mare decât în fructele plantelor de cultură.

Cu toate considerentele expuse mai sus, studiile efectuate până în prezent nu au putut determina efecte toxice la plantele transgenice de tomate, nici în cazul transgenelor pentru rezistenţă virală, nici în cazul plantelor rezistente la glifosat şi nici în cazul transgenelor cu coacere întârziată.

Un alt transfer genetic suspectat de implicaţii toxice şi alergenice, a fost realizat la soia. După cum se ştie, majoritatea plantelor leguminoase prezintă un deficit în aminoacizi cu sulf. Pentru a satisface necesităţile nutriţionale ale animalelor şi oamenilor s-a pus la punct o strategie genetică de modificare a balanţei aminoacizilor esenţiali din soia. Acest lucru a fost realizat prin transferul genei pentru 2S-albumină, o proteină ce conţine metionină într-un procent de 18 % şi alţi aminoacizi cu sulf în proporţie de 8 %, de la o specie de nuc brazilian (Bertholletia excelsa).

Nucile braziliene prezentau însă un istoric consistent privind reacţii anafilactice la o serie de indivizi sensibili. Prin urmare, în momentul în care s-a luat decizia transferului, a fost necesar să fie luat în calcul potenţialul alergenic al soiei modificate genetic. S-a colectat ser de la pacienţii alergici la nucile braziliene şi s-au făcut teste imunologice pentru a determina abilitatea proteinelor din soia transgenică, netransgenică şi a 2S-albuminei de a se lega de IgE. Rezultatele au demonstrat că potenţialul alergenic a nucilor braziliene se transmite, fără să-şi piardă reactivitatea, la soia modificată genetic, aceasta devenind alergenică pentru pacienţii sensibili la nucile braziliene.

Potențialul alergenic al 2S-albuminei a fost studiat și pe șoareci. Rezultatele obținute nu au fost clare, nefiind identificat un complex 2S-albumina – IgE. Acest rezultat a fost pus însă pe seama toleranței animalelor de experiență la antigeni orali, consecință a depărtării filogenetice a acestora de om. Datorită riscurilor alergenice implicate, linia transgenică de soia nu a ajuns niciodată pe piață.

Tot la soia, a fost transferată și gena pentru rezistență la glifosat, genă provenită din Agrobacterium sp. CP4 (CP4 EPSPS). Studiile efectuate în acest caz au urmărit evidențierea unor posibile omologii ale secvențelor de aminoacizi ale proteinei implicate, cu secvența de aminoacizi a unor alergeni cunoscuți, precum și digestibilitatea proteinei, masa, gradul de legare cu glucide sau gradul de glicozilare etc.

CP4 EPSPS nu a prezentat omologie semnificativă a secvenței de aminoacizi cu nici una dintre proteinele alergenice cunoscute. Deși criteriul de masă moleculară (46,4 kDa) se potrivește cu cel a majorității alergenilor alimentari cunoscuți (care au între 10 și 70 kDa), proteina nu prezintă alte caracteristici similare alergenilor cunoscuți. Mai mult, s-a constatat că aceasta este termolabilă și digestibilă la nivelul sucurilor gastrice și intestinale. După izolare și purificare, s-a constatat că CP4 EPSPS nu este glicozilată, ceea ce este în contrast cu majoritatea proteinelor alergenice. Totodată, spre deosebire de majoritatea produselor alergenice, în care proteinele implicate sunt prezente în cantități mari, proteina CP4 EPSPS, este exprimată într-o cantitate foarte mică, de 0,08 % din proteina totală.

O altă direcție a cercetărilor, a urmărit dacă transferul genei pentru rezistență la glifosat afectează sau nu cantitativ și calitativ alți alergeni endogeni din soia. Studiul a fost posibil prin prepararea unui extract proteic din flori de soia, derivate de la soia transgenică și compararea reactivității serice a acestuia cu reactivitatea serică a altor 3 preparate, obținute din cultivarii de soia nemodificate. Testele efectuate pe ser, care conținea anticorpi IgE specifici pentru soia, de la 5 pacienți alergici au arătat următoarele:

– cantitățile și prezența proteinelor alergenice endogene a fost comparabilă în toate probele, ceea ce pledează pentru concluzia că transferul genetic nu a afectat în nici un fel reactivitatea alergenilor endogeni;

– nu există nici un motiv pentru ca transferul genei CP4 EPSPS să poată fi considerat un risc alergenic semnificativ.

După mai mulți ani de aplicare practică, pe scară largă nu au fost înregistrate evenimente alergice deosebite la soia glifosat tolerantă.

Problema riscurilor toxicologice și/sau alergice, s-a pus la majoritatea plantelor modificate genetic. Până în acest moment nu există nici o concluzie clară privind riscurile toxice sau alergenice ale transferului de gene, problema rămânând extrem de controversată. Orice transfer de gene la plantele comestibile crează un nou aliment. Impactul acestuia asupra siguranței alimentare a populației depinde de o serie de factori eterogeni, între care structura genetică și comportamentul alimentar, nu sunt deloc de neglijat. Spre exemplu, alergiile la orez sunt foarte rare în lumea occidentală, dar sunt foarte comune în lumea asiatică. De asemenea, introducerea fructelor de kiwi în alimentația europenilor a determinat apariția unor alergii la acestea, alergii necunoscute anterior.

Dovezile strânse până în acest moment sugerează că, atât ameliorarea convențională cât și ingineria genetică, pot altera alergenicitatea hranei într-un sens sau altul. Testele clasice pentru evidențierea alergenilor sunt eficiente și pentru identificarea alergenilor din plantele modificate genetic.

O problemă semnificativă studiată de specialiști este aceea a controlului alergenicității hranei, deoarece deși produsele obținute prin ameliorare convențională prezintă aceleași riscuri alergice ca și produsele transgenice, doar acestea din urmă sunt supuse în mod obligatoriu unor teste specifice, înainte de punerea lor pe piață.

15.2. TOXICOLOGIE BIOTEHNOLOGICĂ AGRICOLĂ

Biotehnologia agricolă se clasifică, în biotehnologii vegetale și biotehnologii zootehnice. Factorii de risc toxic în biotehnologiile vegetale se corelează cu noțiuni de **micologie, bacteriologie, entomologie, fitopatologie, agrochimie, protecție a plantelor**, precum și cu **tehnologii de reciclare a produselor reziduale**. La nivelul **biotehnologiilor fermentative vegetale** și a **biotehnologiilor** în **legumicultură, pomicultură, viticultură**, în cultura **cerealelor, a plantelor tehnice**, apar de asemenea riscuri toxicologice.

Biotehnologiile zootehnice prezintă la rândul lor o toxicologie specifică, determinată spre exemplu, de posibilitatea permanentă de contaminare cu **microorganisme nedorite**, precum și de efectul nociv al metaboliților toxici apăruți pe parcursul **diluării, stocării** și/sau **congelării** unor eșantioane biologice (diverse celule, ser, material seminal etc).

15.2.1. Aspecte toxice asociate biotehnologiilor vegetale

15.2.1.1. Pesticidele de sinteză

Pesticidele de sinteză, cu spectru mare de acțiune specifică, a căror industrie s-a dezvoltat puternic după 1944, prezintă o sursă de risc toxic, în special prin remanența în materiile prime de origine vegetală, utilizate în biotehnologii (biomasă fotosintetică, cereale, reziduuri de cereale). Multe dintre acestea sunt interzise, dar o mare parte sunt utilizate în continuare în agricultură. După domeniul de acțiune, pesticidele pot fi: erbicide, fungicide, insecticide, acaricide, nematocide, rodenticide, moluscide etc (*Davidescu, D și colab, 1992, Protecția chimică în agricultură VII, Ed. Acad. Române*). Pesticidele cumulate în materialul vegetal, prezintă peste o anumită limită, toxicitate asupra animalelor cu sânge cald, în special. Pesticidele au în general, un efect toxic asupra întregului mediu ambiant

(sol, apă, aer), prin reziduuri, afectând lanţurile alimentare. Balansarea toxicităţii şi a poluării mediului, datorate protecţiei chimice în agricultură, se poate realiza pe baza conceptului de "combatere integrată", care îmbină metode chimice, fizice, biotehnologice, tehnologice.

Toxicitatea pesticidelor poate fi directă (se măsoară prin doza letală DL_{50}), atunci când substanţa toxică ca atare, provoacă efecte vizibile şi indirectă, prin metaboliţii toxici care apar în procesele de degradare din organisme. Toxicitatea indirectă se manifestă pe termen lung, datorită fenomenelor de acumulare şi îmbracă forme foarte grave (efecte mutagene, teratogene, cancerigene, malformaţii, sterilitate etc).

Evaluarea pesticidelor şi a limitei maxime admise a reziduului toxic (MRLs) remanent în produsele agricole şi horticole se face în strânsă corelaţie cu prevederile "Codex Alimentarius". Cu toate că o parte din cantitatea de pesticide este indepărtată din produse prin spălare sau procesare, rămân totuşi cantităţi însemnate, spre exemplu în mere şi tomate, precum şi în sucul de mere sau de tomate. În consecinţă, actualmente, pe plan mondial se testează remanenţa în alimente, apă etc a aproximativ 469 pesticide, clasificate în trei grupe principale, a căror toxicitate trebuie evaluată, atât în produsele proaspete, cât şi în cele procesate.

În primul grup se înscriu 228 substanţe cu cel mai ridicat risc toxic pentru sănătatea populaţiei, respectiv: pesticide organofosforice, pesticide organoclorurate şi pesticide carbamice, potenţial cancerigene, pesticide relativ inerte chimic şi pesticide a căror doză de utilizare depăşeşte doza de referinţă (RfD – doza care consumată 70 de ani, nu provoacă reacţii adverse). În al doilea grup sunt incluse 93 de pesticide, care nu fac parte din primul grup, dar care sunt de asemenea potenţial cancerigene, precum şi cele cu aceleaşi efecte, care urmează a fi înregistrate, pe măsură ce intră în utilizare. Sunt considerate ca având a doua prioritate din punct de vedere al toxicităţii. Al treilea grup conţine 148 de pesticide de natură biologică, ingrediente inerte şi pesticide cu substanţe active înregistrate încă din 1984.

Pesticidele şi-au găsit locul în cele două mari clase de substanţe toxice, anume: substanţe ce atacă sistemul endocrin (EDs – endocrine disrupting chemicals) şi substanţe organice poluante persistente (POPs – persistant organic pollutants), care rezistă degradărilor fotolitice, biologice, chimice şi se acumulează la nivelul ficatului, în cantităţi mai mari decât în mediul înconjurător. Acestea din urmă, majoritatea compuşi halogenţi, nu sunt solubile în apă, se depozitează în consecinţă în ţesuturile grase, de unde pot fi recirculate cu pericol acut de intoxicaţie din când în când, odată cu slăbirea organismului. De asemenea, majoritatea sunt semivolatile (ex. PCB – bifenil policlorurat) şi pot fi răspândite uşor în atmosferă (au fost puse în evidenţă, inclusiv în deşerturi, în Arctica şi Antarctica).

Organocloruratele, precum: dioxine, furani, PCB, aldrin, endrin, dieldrin, hexaclorbenzen, mirex, toxafen, heptaclor, clordan, DDT etc, au invadat practic lumea modernă, în cantităţi uriaşe, fiind utilizate în industria maselor plastice (polivinili cloruraţi), ca solvenţi, în agricultură (pesticide), în farmacie la

prepararea medicamentelor. Aceste pesticide prezintă riscuri de toxicitate pentru sistemele imunitare ale organismelor (distrug vitaminele şi atacă tiroida, favorizează infecţiile microbiene repetate şi determină dereglări reproductive), argument în favoarea denumirii lor cu termenul de **imunotoxice** (*Byung – Youl Oh, 2002, Pesticide residues for food safety and enviroment protection, Nation. Instit. of Agric. Science Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea*).

În anii 90 ai secolului trecut s-a observat o recrudescenţă a cancerelor de sân şi scăderea dramatică a numărului şi viabilităţii spermatozoizilor la om, dar şi la animale, fiind incriminate pesticidele care atacă sistemul endocrin, sinteza hormonilor şi implicit funcţia de reproducţie (EDs – endocrine disrupting chemicals). În afară de cele aproximativ 9000 substanţe active ale pesticidelor, posibil participante în aceste procese, alte substanţe chimice utilizate în cosmetică, ca aditivi alimentari sau suplimente nutriţionale, au acelaşi efect. Printre pesticidele cunoscute ca având impact asupra sistemului endocrin, putem enumera: 2,4–D, alaclor, benominyl, carbaryl, cypermetrin, dicofol, endosulfan, etilparation, malation, mancozeb, methomyl, metiram, metribuzin, trifluralin, vinclozolin, fenvalerat.

Toxicitatea se răsfrânge total asupra mediului înconjurător, cunoscut fiind efectul distructiv al alchil halogenilor asupra stratului de ozon (spre exemplu: bromura de metil). O listă a pesticidelor ce prezintă cel mai ridicat risc de toxicitate, dintre care unele sunt poluanţi persistenţi (POPs), adoptată de convenţiile U.E., poate fi observată în tabelul 15.6.

Tabelul 15.6

Lista pesticidelor extrem de toxice, adoptată de convenţiile internaţionale

Denumirea pesticidului	Poluant persistent (POPs)
2,4,5-T (acid 2,4,5-triclor fenoxi acetic)	Da
Aldicarb	-
Aldrin	Da
Binapacryl	-
Captafol	-
Clordan	Da
Clordecon	-
Clordimeform	-
Clorobenzilat	-
DBCP	-
DDT	Da
Dieldrin	Da
Dinoseb	-
1,2-Dibrometan (EDB)	-
Endrin	Da
Diclor etilena	-
Etilen oxid	-

Fluoracetamida	-
HCH	-
Heptaclor	Da
Hexaclorbenzen	-
Lindan	-
Compuşi ai mercurului (oxid mercuric, clorură mercuroasă, calomel, compuşi alchil şi aril mercurici)	-
Bromura de metil	-
Mirex	Da
Paraquat	-
Pentaclorfenol	Da
Toxafen	Da
Metil- paration	-
Paration	-
Crocidolit	-
Bifenil polibromurat PBB)	-
Bifenil policlorurat (PCB)	-
Trifenil policlorurat (PCT)	-
Tris (2,3-dibrompropil fosfat)	-

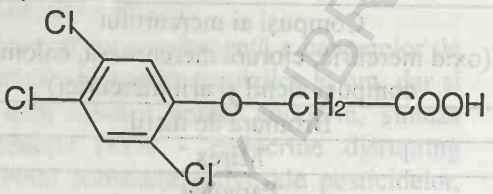
Lista cuprinde practic pesticidele utilizate cu precădere în agricultură, spre exemplu: erbicide (2,4,5-T , paraquat), insecticide (aldicarb, aldrin, DDT, endrin, heptaclor, lindan, mirex, paration), fungicide (hexaclorbenzen), nematocide (DBCP), rodenticide (fluoracetamida). Din această cauză, din cele 834 pesticide folosite în ultimul dceniu (ne referim la substanţa activă şi nu la produsele comerciale care sunt diversificate), aproximativ 500 au fost interzise în Europa sau în diferite ţări europene (*Codex Alimentarius Commission, Food and Agriculture Commission of UN – FAO, Intergovernmental Forum on Chemical Safety – IFCS, World Health Organization, WHO Food Safety Programme, United Nations Environmental Programme – UNEP etc*).

Toxicitatea pesticidelor depinde de o serie de factori, printre care: durata expunerii la acţiunea toxică, calea de pătrundere a toxicului în organism, modul în care se biodegradează sau se bioactivează în organism, starea organismului, selectivitatea de specie, vârstă, formele izomere ale toxicului etc. Din punct de vedere chimic, substanţele toxice utilizate în agricultură sunt extrem de variate, anume: compuşi organo-fosforici, compuşi organocloruraţi, carbamaţi, piretroizi, ciclodiene, rotenoide, nicotinoizi, derivaţi chinolinici, substanţe pe bază de sulf, cupru, mercur, arsen, bariu, compuşi organometalici, benzimidazoli, derivaţi ai benzenului, aminelor, amidelor, nitroderivaţilor etc. Noţiunea de "pesticid" se referă în special la compuşii organo-fosforici, organocloruraţi, organomercurici şi carbamaţi.

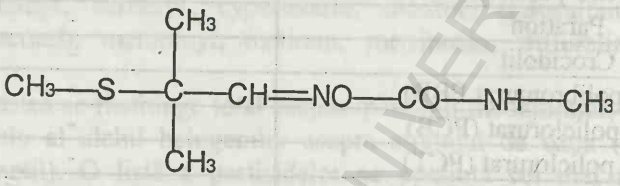
Descriem în continuare câteva caracteristici ale unor pesticide ce se regăsesc în lista celor mai toxice substanţe (conform tabelului 6).

Acidul 2,4,5 triclor fenoxiacetic sau **2,4,5 T** este un erbicid hormonal puțin selectiv, distruge vegetația lemnoasă și devitalizează arborii, arbuștii, mărăcinișurile. Este un poluant persistent și deosebit de toxic. Se regăsește în materiile prime vegetale, fiind insolubil în apă.

Acid 2,4,5 triclor fenoxiacetic
(2,4,5 T)

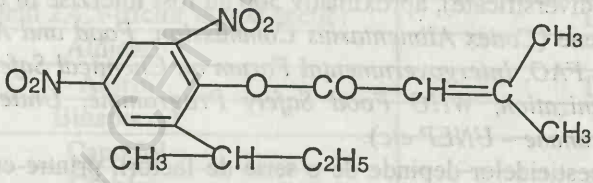


Aldicarb (O-N-metil-carbamat de 2-metil-2-tiometil-propionaldoxima) are spectru larg de acțiune, este insolubil în apă, fiind utilizat drept: insecticid, acaricid și nematoxid (DL_{50}=0,93 mg/Kg corp).



Aldicarb

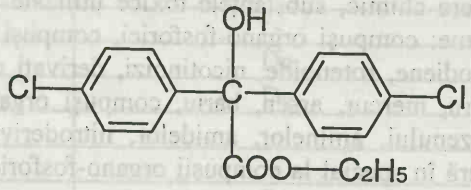
Binapacryl (esterul 2,4-dinitro-O-secbutil fenil al acidului dimetil acrilic) este un toxic de contact, insolubil în apă, are acțiune asupra acarienilor, dar se utilizează și ca fungicid, având DL_{50}=120 mg/Kg corp. Este periculos pentru pești, reziduu admis fiind de numai 0,3 mg/Kg corp. Se utilizează la stropirea livezilor pentru combaterea "făinării merilor și perilor", acolo unde organofosforicele nu sunt eficiente. Își manifestă fitotoxicitatea asupra viței de vie, piersicului și trandafirului.



Binapacryl

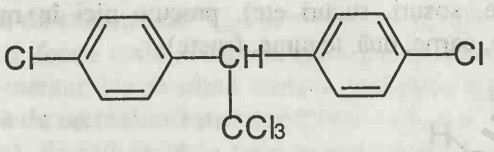
Clorbenzilatul (4,4-diclorbenzilat de etil) este eficient împotriva acarienilor, în toate stadiile de dezvoltare, fiind folosit în consecință la stropirea culturilor legumicole, pomicole, inclusiv citrice și plante ornamentale. Este insolubil în apă.

Clorbenzilat



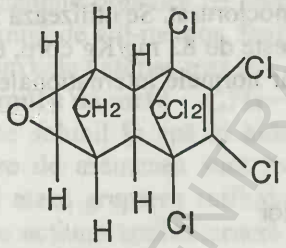
DDT (p, p'-diclor-difenil-tricloretan) este un insecticid deosebit de toxic, înscriindu-se în categoria poluanților persistenți. Odată aplicat, rezistă ani întregi

într-o anumită zonă (vegetație și sol), cumulându-se și poluând inclusiv cursurile de apă freatică. Este insolubil în apă. Această substanță prezintă trei izomeri (p, p'; o, p' și o, o'), dar numai izomerul p, p' este toxic, exemplificând relația dintre toxicitate și izomerie. Are acțiune de contact și de ingestie. Afectează în special sistemul nervos al organismelor, fiind toxic pentru: albine, entomofagi, mamifere. S-a observat că favorizează dezvoltarea păianjenului roșu. DL_{50}=200 mg/Kg corp, dar reziduu nu trebuie să depășească 0,1-0,5 mg/Kg corp pe legume, fructe și produse vegetale în general.

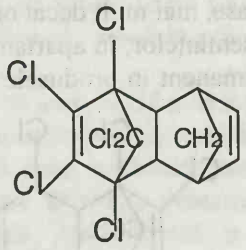


DDT

Dieldrinul (endoexo-hexaclor-epoxi-octohidro-dimetano-naftalina) este un insecticid de contact și de ingestie, se poate utiliza și la tratarea semințelor. Remanența pe plantă, sol, apă este deosebit de lungă. Are o puternică activitate fitotoxică și o puternică toxicitate pentru animalele cu sânge cald, datorată modului în care acționează asupra sistemului nervos, DL_{50} fiind de 46 mg/Kg corp. Este insolubil în apă. **Aldrinul,** de 5-6 ori mai toxic decât dieldrinul, utilizat tot ca insecticid, este un toxic puternic al sistemului nervos. Provoacă convulsii și contracții tetanice puternice.

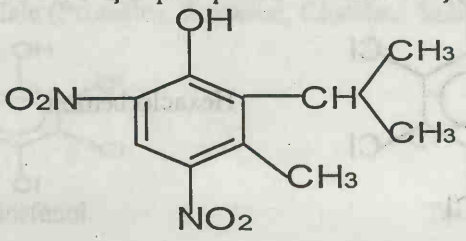


Dieldrin



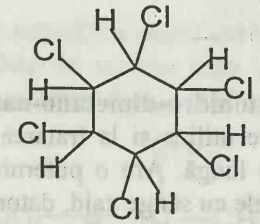
Aldrin

Dinoseb ([metil-1-propil]-2-dinitro-4,6-fenol) este un erbicid de contact și de ingestie (acționează asupra dicotiledonatelor în faza de plantulă). Se utilizează în lanurile de graminee, leguminoase, în livezi, la vița de vie. Prezintă pericol de aprindere și colorează în galben suprafețele cu care vine în contact, este insolubil în apă. Are de asemenea, acțiune acaricidă și fungicidă, distrugând inclusiv formele de rezistență a ciupercilor. DL_{50}=40 mg/Kg corp, reziduu admis fiind de 0,05 mg/Kg corp. Pătrunde ușor prin pielea mamiferelor și poluează vânatul, animalele acvatice etc.



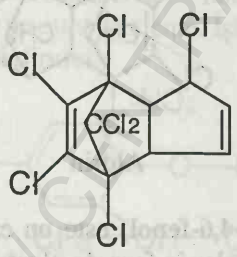
Dinoseb

HCH (izomer gama) sau **Lindan (1,2,3,4,5,6-hexaclorciclohexan)** este un insecticid de contact, de ingestie şi respirator, liposolubil şi volatil. Din punct de vedere chimic, substanţa prezintă 11 stereoizomeri. Acţiune toxică prezintă numai izomerul gama. Cu toate că nu se poate vorbi de o fitotoxicitate propriu-zisă, totuşi s-a observat modificarea temporară a metabolismului plantelor, în sensul creşterii conţinutului în aminoacizi şi glucide. Atacă sistemul nervos, inhibând sinteza acetilcolinei, irită tegumentele şi mucoasele. DL_{50} este de 25 mg/Kg corp. Nu se admite nici un fel de reziduu în produsele biotehnologice alimentare (produse lactate, produse din carne, sosuri, sucuri etc), precum nici în materiile prime vegetale sau animale (lapte, carne, ouă, legume, fructe).



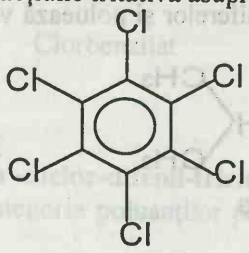
HCH, Lindan

Heptaclor (1,4,5,6,7,8,8'-heptaclor tetrahidro-4,7-metano-inden), este un insecticid de contact, de ingestie, de respiraţie, liposolubil şi foarte stabil la lumină, căldură, umiditate, mediu acid, mediu bazic şi agenţi oxidanţi. În organisme se bioactivează transformându-se în epoxid, care se acumulează în ţesuturile adipoase, mai mult decât orice alt organoclorurat. Se utilizează în grădini, livezi, tratarea seminţelor, în apartamente. DL_{50} este de 82 mg/Kg corp, este iritant al pielii, este remanent în produsele agricole, dar normele internaţionale nu admit niciun reziduu.



Heptaclor

Hexaclorbenzenul este utilizat la tratarea seminţelor, răsadurilor şi puietului. Combate diferite bacterioze şi este activ împotriva unor infecţii fungice (mălura grâului, tăciunele porumbului, fusarioze etc). Se utilizează în amestecuri cu alte organoclorurate, ditiocarbamaţi şi organomercurice. DL_{50} este de 1700 mg/Kg corp. Are acţiune iritativă asupra pielii, mucoaselor repiratorii, ochilor.



Hexaclorbenzen

Compuşi cu mercur. Compuşii mercurului au o bună acţiune anti-criptogamică, dar se acumulează în mediu şi sunt deosebit de toxici. Au fost utilizaţi pe scară largă la tratarea seminţelor de cereale (acetat de fenil mercur sau Germisan):

- **acetat de fenil-mercur** $C_6H_5—Hg—O—CO—CH_3$ (Germisan, Agrosan). Activ contra bacteriilor, fungilor, helminţilor (Tilletia controversa, Ustilago triticii, Fusarium nivale, Phytium spp., Helmithosporium turcicum etc). Este deosebit de toxic, DL_{50}=17 mg/Kg corp. Irită pielea, ochii, mucoasele. Nu se admit urme în plantele furajere.

- **clorura de etil-mercur** $C_2H_5—Hg—Cl$ (Criptodin, Granosan). Este un compus volatil, foarte toxic, DL_{50}=18 mg/Kg corp, având aceiaşi activitate ca şi acetatul de fenil-mercur. Nu se admit urme în produsele agricole.

- **clorură de metoxi-etil-mercur** $CH_3—O—CH_2—CH_2—Hg—Cl$ (Ceresan, Aretan). Se utilizează la tratamentul tuberculilor de cartofi, al bulbilor florali, fiind activ contra bacteriilor şi fungilor. Nu se admit urme pe produsele agricole, datorită toxicităţii mari, DL_{50}=50 mg/Kg corp.

- **silicat de metoxi-etil-mercur**

$CH_3—O—CH_2—CH_2—Hg—O—SiO_2H$

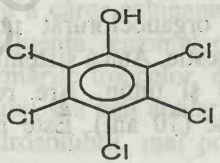
(Ceresan universal, Saprosan, Derisan). Foarte toxic DL_{50}=75 mg/Kg corp, provoacă arsuri pe piele. Se utilizează la tratarea seminţelor, în amestec cu hexaclorbenzen. Nu este toxic pentru albine. Nu se admite niciun reziduu în produsele agricole.

Substanţele organice ce conţin mercur sunt diversificate (cianură de etil-mercur, bromură de etil-mercur, fenil-mercur-uree etc), având în principal aceleaşi efecte, precum cele descrise mai sus.

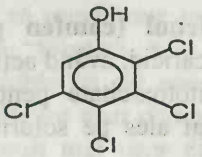
Bromura de metil $CH_3—Br$ Este un nematocid şi insecticid în stare gazoasă. Este solubil în apă şi hidrolizează, cu eliberare de acid bromhidric şi metanol, care de asemenea sunt toxice. Are acţiune narcotică lentă, metilează proteinele şi atacă gruparea sulfhidril a enzimelor. Distruge nematozii, insectele, acarienii, are acţiune antibacteriană şi antifungică. Atacă stratul de ozon. Nu se admit reziduuri în produsele alimentare, deoarece toxicitatea este deosebit de mare, o doză de 1000 mg/Kg corp în aer provocând moartea în 30 de minute.

Mirex (Decloran) este un insecticid de ingestie. Prezintă un efect fitotoxic, iar pentru organismele cu sânge cald este un toxic moderat. Tratamentul cu mirex se face de obicei, înainte de semănat.

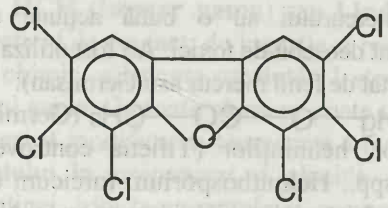
Pentaclorfenol. O problematică mult discutată, datorită amplorii pe care a luat-o în agricultură şi silvicultură, este utilizarea mondială a **pentaclorfenolului** şi a unor derivaţi, în principal ca ierbicid, insecticid şi dezinfectant (în păduri, parcuri ornamentale, controlul termitelor, dezinfectarea bazinelor acvatice etc), sub diferite denumiri comerciale (Pentaclor, Pentacon, Clorofen, Santofen şi altele).



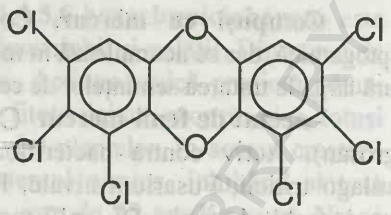
Pentaclorfenol



Tetraclorfenol



Hexaclor-dibenzo-furan



Hexaclor-dibenzo-p-dioxina

Acest pesticid a fost ulterior detectat în laptele praf, sucuri, pâine, cereale (grâu, orez), zahăr, în cantităţi de 1-100 mg/Kg corp. Toxicul interferează în celule cu mecanismele de producere a energiei, respectiv cu fosforilarea oxidativă, accelerând metabolismul şi degajarea de căldură. Limitele letale DL_{50} sunt largi la adulţi şi sunt cuprinse între 20-145 mg/Kg corp. Toxicul se acumulează în ficat, rinichi, creier, splină şi ţesutul adipos. Organismele elimină o parte a toxicului prin conjugare cu acid glucuronic, când rezultă tetraclorohidrochinonă.

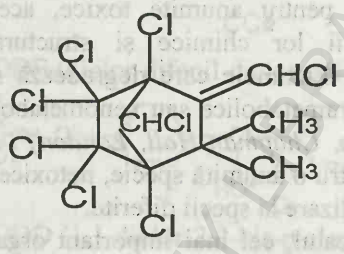
S-a constatat că expunerea la clorofenoli provoacă carcinoame şi aberaţii cromozomiale, cu efecte severe asupra funcţiei de reproducere. De asemenea, toxicul are efecte teratogene, provocând anomalii fetale, la nivelul scheletului şi organelor sexuale. Au fost semnalate efecte supra sângelui (leucemii) şi asupra sistemului nervos (neurotoxic). Încă din 1989 pentaclorul şi derivaţii au fost interzişi în 10 ţări şi restricţionaţi în alte 9 ţări (*Fisher, B., 1991, Pentachlorophenol: Toxicology and Environmental Fate, Journal of pesticide reform, Vol. 11, No. 1).*

Un alt toxic răspândit în sol, aer, apă, alimente este **dioxina** şi substanţele înrudite (DLCs). Produsele biotehnologiilor agricole şi industriale sunt în consecinţă poluate cu acest pesticid. DLCs-urile se elimină extrem de greu din organisme, având tendinţa de a se acumula, aşa încât, chiar dacă expunerea unui organism la un nivel de dioxină nu se modifică, cantitatea detectată, în special în ţesuturile adipoase, creşte. Intoxicaţia cu dioxină atrage după sine apariţia cancerului, a diabetului, a afecţiunilor de piele, sensibilizează sistemul imunitar şi perturbă sinteza hormonilor. Practic, toate produsele biotehnologice alimentare (lapte, brânzeturi, preparate din carne, sosuri, peşte, conserve diverse, fructe, sucuri etc) conţin dioxină, preluată odată cu materiile prime agricole. Expunerea cea mai mare o au copiii, prin consumul crescut de lapte şi produse lactate *(Bailer, A. J., 2002, Reportbrief, Dioxins and dioxin-like compounds in the food supply: strategies to decrease exposure, Miami Univ. Oxford, Ohio).*

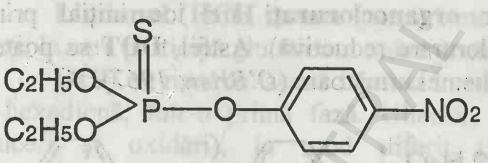
Toxafenul (camfen policlorurat) este un organoclorurat utilizat ca insecticid şi acaricid, având acţiune de contact şi de ingestie. Atacă sistemul nervos şi prezintă fitotoxicitate pentru: prun, piersic, cais şi tutun. Are remanenţă prelungită, mai ales pe solurile nisipoase şi argiloase (10 ani). Este reţinut în

produsele alimentare şi în furaje. Este deosebit de toxic, DL_{50}=40 mg/Kg corp. Reziduu admis este de 0,1 mg/Kg corp.

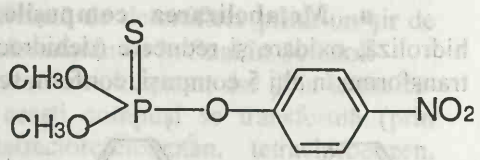
Toxafen



Paration (O,O-dietil-O-4-nitrofenil tiofosfat) şi **Metil-paration (O,O-dimetil-O-4-nitrofenil tiofosfat)** sunt compuşi organofosforici liposolubili, utilizaţi ca insecticide de contact, de ingestie şi de respiraţie, având şi efect acaricid. Parationul se bioactivează în organism, trecând în paraoxon, acesta din urmă inhibând puternic colinesteraza, fapt pentru care aceste organofosforice sunt extrem de toxice, cu efect imediat asupra sistemului nervos. Doza letală de paration este DL_{50}=13 mg/Kg corp, iar toxicitatea cutanată este de 21 mg/Kg corp. Reziduurile permise pe alimentele vegetale sunt de max. 1 ppm. Metilparationul este uşor mai activ decât parationul, ca acţiune de şoc, având DL_{50}=14 mg/Kg şi pătrunde la fel de rapid prin piele.



Paration



Metilparation

15.2.1.2. Metabolizarea unor pesticide de sinteză şi depoluarea biotehnologică

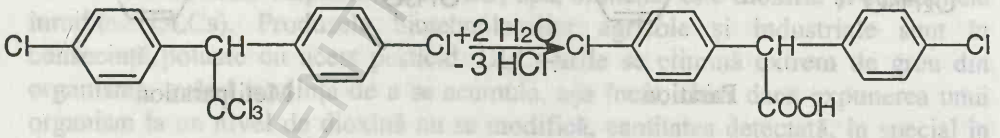
Transformările pe care le suferă toxicele după pătrunderea în organism depind în mare măsură de structura lor chimică. De altfel, traversarea membranelor celulare depinde la rândul ei de structura chimică şi mărimea moleculei, aşa încât pesticidele pot fi transportate printr-un transfer pasiv, un transfer activ, sau prin pinocitoză (compuşii macromoleculari). Are loc practic o localizare a toxicelor în organele a căror echipament enzimatic e capabil să transforme toxicul respectiv. Sub influenţa enzimelor celulare (din diferite ţesuturi sau organe) încep transformările toxicelor, care sunt cu atât mai ample cu cât compusul este mai liposolubil sau mai apolar. Pe parcursul biodegradărilor apar compuşi din ce în ce mai hidrosolubili, mai polari, care se elimină mult mai uşor din organism pe diferite căi (urină, perspiraţie, fecale etc).

Ulterior metabolizării toxicelor, activitatea toxidinamică variază de la toxic la toxic, astfel încât unele se inactivează, adică organismul se detoxifică, pe când altele se bioactivează, trecând într-un derivat mai toxic. Nu există enzime special sintetizate pentru anumite toxice, acestea fiind degradate enzimatic pe baza similitudinii lor chimice şi structurale cu metaboliți proprii organismelor respective. Enzimele care degradează substanțe străine de organism se numesc enzime parametabolice sau xenometabolice (*Williams, R., T., 1959, Detoxications mechanism, Chapman Hall, London*) . Aşa se explică de ce unele substanțe sunt toxice pentru o anumită specie, netoxice pentru alta şi de ce un toxic ia căi diferite de metabolizare la specii diferite.

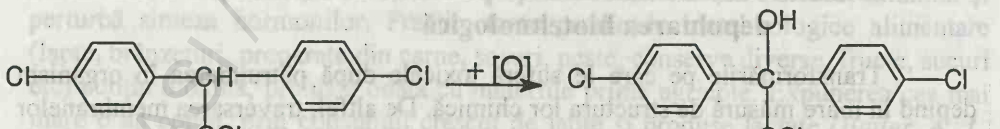
Ficatul, cel mai important organ în reacțiile de detoxifiere, constituie o barieră importantă pentru foarte multe toxice. Există toxice "excepționale" pentru care ficatul nu posedă mecanisme de detoxifiere (toxina botulinică, stricnina, alcoolul metilic etc). S-a constatat că o serie de toxice se acumulează la nivelul ficatului, în special anumite elemente chimice (As, Hg, Pb, P) şi alcaloizi. Multe toxice liposolubile se acumulează în țesuturile adipoase, unde pot fi descompuse şi eliminate sau se metabolizează cu întârziere, provocând uneori intoxicații acute fără motiv aparent.

Prin reacțiile din faza I, anume: oxidarea, reducerea şi hidroliza, se introduc în molecula toxicului grupări reactive, cât mai polare (hidroxil –OH, sulfhidril –SH, carboxil-COOH, amino $-NH_2$). Enzimele care acționează în această fază sunt: oxidaze, reductaze şi hidrolaze.

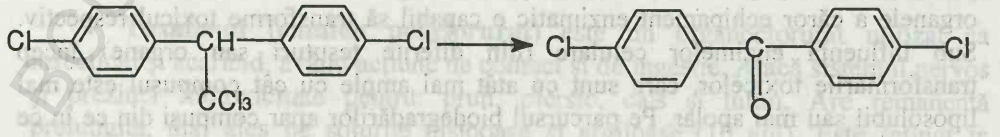
a. Metabolizarea compuşilor organocloruraţi are loc inițial prin hidroliză, oxidare şi reducere (dehidroclorurare reductivă). Astfel, **DDT** se poate transforma în alți 5 compuşi, conform schemei următoare (*O'Brien, 1967*):



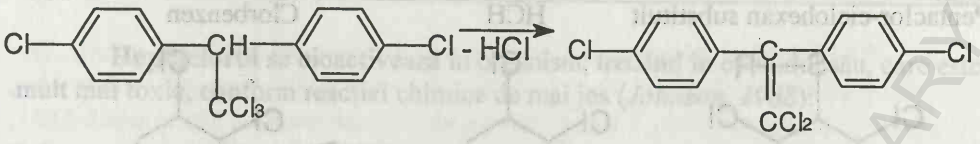
DDT (diclorfenil-triclor-etan) DDA (acid bis clor-fenil acetic)



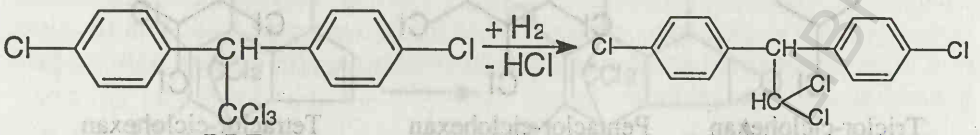
DDT Kethane



DDT Diclorbenzofenona



DDT DDE (diclor-difenil-diclor-etilenă)



DDT DDD (1,1-diclor-2,2-bis-p-clorfenil)

Toate aceste reacţii sunt catalizate de enzime specifice (hidrolaze, oxidaze, reductaze). La vertebrate se formează cu precădere DDA. La insecte se formează preponderent DDE, fapt pentru care insectele se pot adapta şi capătă rezistenţă la DDT, prin sinteza în cantităţi mai mari a enzimei de biotransformare a DDT în DDE, anume: dehidroclorinaza.

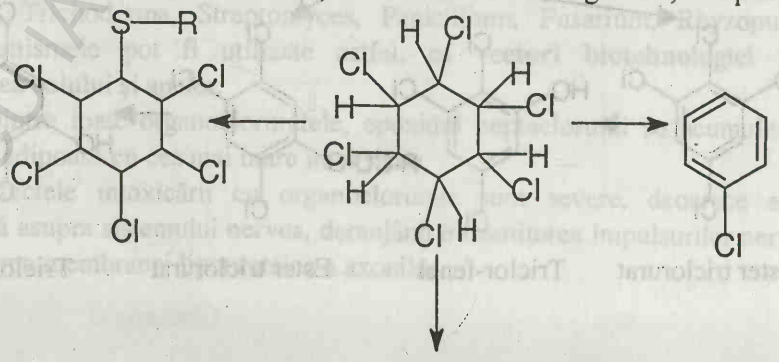
Depoluarea biotehnologică a apelor şi solurilor contaminate cu DDT şi derivaţii lui se poate face cu ajutorul unor microorganisme, precum: Aerobacter aerogenes, Pseudomonas fluorescens, Escherichia coli, Acetomonas sp., Hydrogenomonas sp. şi Streptomyces. Fungul Mucor alternans realizează de asemenea, biodegradarea acestor pesticide, până la produşi solubili în apă, cum ar fi: p-clorfenil-etanol şi p-clorfenil-gliceraldehidă (*Baric, 1984*).

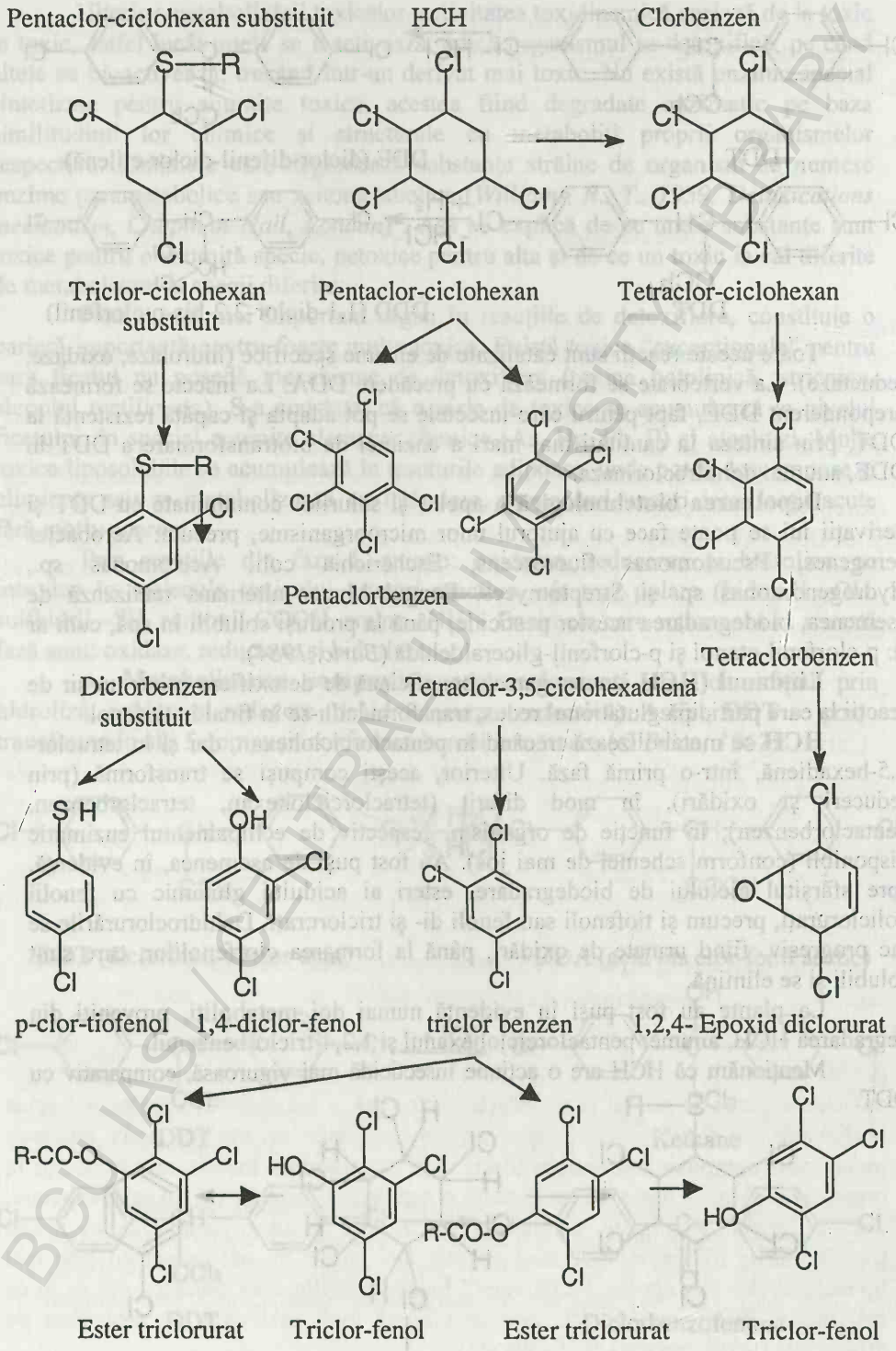
Lindanul (**HCH** izomer gama) beneficiază de detoxifiere printr-un şir de reacţii la care participă glutationul redus, transformându-se în final în tiofenol.

HCH se metabolizează trecând în pentaclorciclohexan, dar şi în tetraclor-3,5-hexadienă, într-o primă fază. Ulterior, aceşti compuşi se transformă (prin reduceri şi oxidări), în mod diferit (tetraclorciclohexan, tetraclorbenzen, pentaclorbenzen), în funcţie de organism, respectiv de echipamentul enzimatic disponibil (conform schemei de mai jos). Au fost puşi de asemenea, în evidenţă, spre sfârşitul ciclului de biodegradare, esteri ai acidului glutamic cu fenolii policloruraţi, precum şi tiofenoli sau fenoli di- şi tricloruraţi. Dehidroclorurările se fac progresiv, fiind urmate de oxidări, până la formarea clorfenolilor, care sunt solubili şi se elimină.

La plante au fost puşi în evidenţă numai doi metaboliţi, proveniţi din degradarea HCH, anume: pentaclorciclohexanul şi 1,2,4-triclorbenzenul.

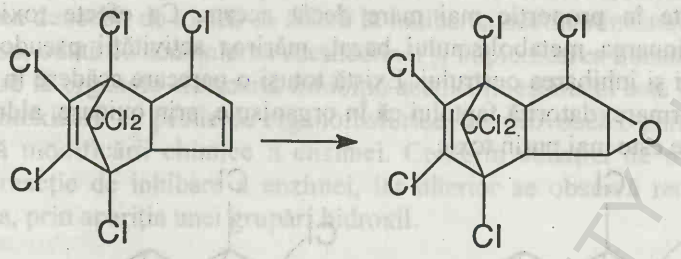
Menţionăm că HCH are o acţiune insecticidă mai viguroasă, comparativ cu DDT.



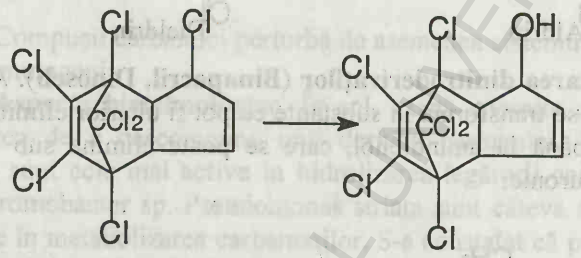


BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

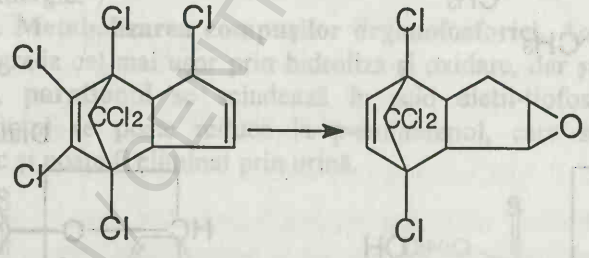
Heptaclorul se bioactivează în organism, trecând în epoxidul său, care este mult mai toxic, conform reacţiei chimice de mai jos (*Johnson, 1988*):



Există **microorganisme** care pot declorura (hidroliză) pentaciclul heptaclorului, în locul atomului de clor apărând o grupare hidroxil:



Alte microorganisme pot metaboliza heptaclorul prin declorurare (la nivelul hexaciclului) şi epoxidare:



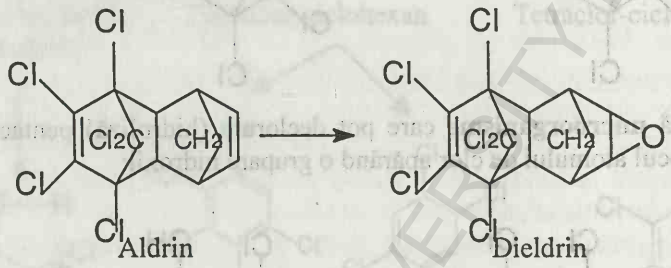
Printre microorganismele care atacă heptaclorul, enumerăm: Bacillus sp., Nocardia, Trichoderma, Streptomyces, Penicillium, Fusarium, Rhyzopus etc. Microorganismele pot fi utilizate astfel, ca **vectori biotehnologici** pentru **depoluarea** solului şi apelor.

Dintre toate organocloruratele, epoxidul heptaclorului se acumulează în ţesuturile adipoase cu cea mai mare intensitate.

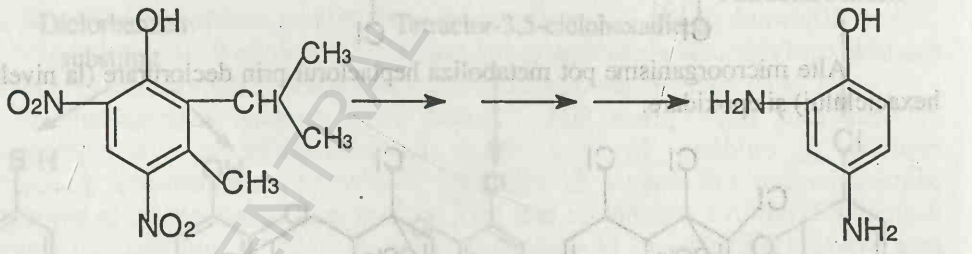
Efectele intoxicării cu organoclorurate sunt severe, deoarece acestea acţionează asupra sistemului nervos, deranjând transmiterea impulsurilor nervoase, prin atacarea membranei lipoproteice a axonilor.

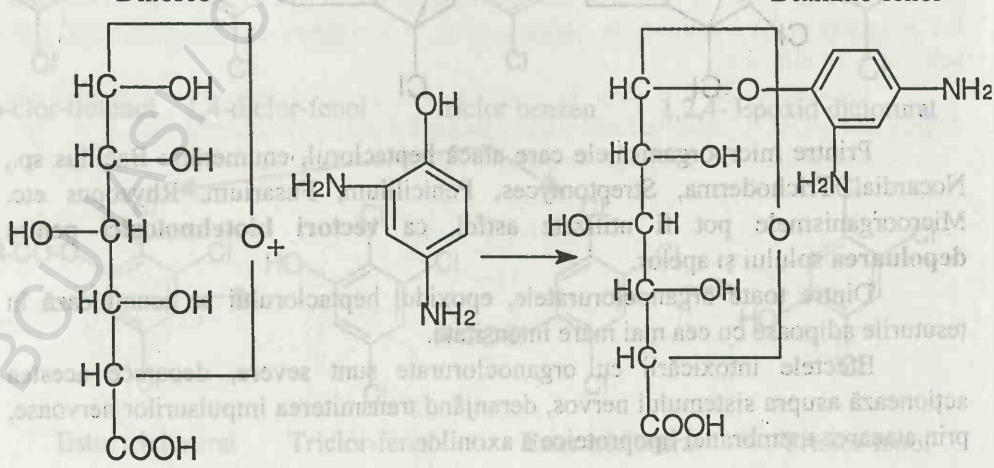
BCU "SI" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dieldrinul şi Aldrinul, au o mare toxicitate, nu sunt atacaţi semnificativ de microorganisme, fapt ce vine în sprijinul argumentării remanenţei lor mari, acolo unde au fost aplicate. S-a constatat că aldrinul are acţiune sinergică cu DDT, dacă se găseşte în proporţie mai mare decât acesta. Ca efecte toxice putem enumera: diminuarea metabolismului bazal, mărirea activităţii pseudocolinesterazice a serului şi inhibarea oestrului. Există totuşi o oarecare scădere în toxicitate prin biotransformare, datorită faptului că în organisme, prin oxidare, aldrinul trece în dieldrin, care este mai puţin toxic.



b. Metabolizarea dinitroderivaţilor (Binapacril, Dinoseb). Aceştia sunt extrem de toxici, dar se transformă în substanţe ce pot fi ulterior eliminate. Astfel, **Dinoseb** se reduce până la aminofenol, care se poate elimina sub forma unui conjugat cu acid glucuronic:





c. Metabolizarea compuşilor carbamici (Aldicarb). Dintre derivaţii carbamici, cei mai toxici sunt N-metil carbamaţii. Metabolizarea acestora se face iniţial prin hidroliză, când are loc desprinderea radicalului N-metil carbamat —CO—NH—CH₃ Acţiunea deosebit de toxică se referă la inhibarea acetilcolinesterazei din ţesuturile nervoase, odată cu acumularea acetilcolinei şi împiedicarea transmiterii influxurilor nervoase la organele efectoare. Inhibiţia acetilcolinesterazei este mai lentă decât în cazul intoxicării cu pesticide organofosforice, dar provoacă o paralizie ireversibilă, datorită modificării chimice a enzimei. Conform ecuaţiei de mai jos, are loc o primă reacţie de inhibare a enzimei, iar ulterior se observă reducerea activităţii acesteia, prin apariţia unei grupări hidroxil.

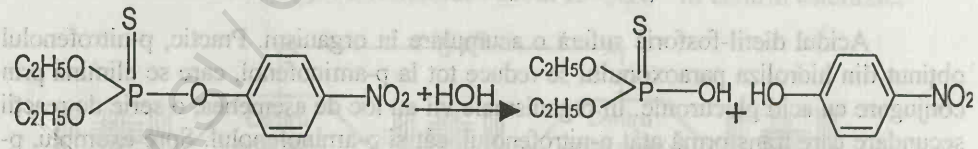
$$\text{Acetilcolinesteraza} + \text{R-CO-NH-CH}_3 \longrightarrow \text{Acetilcolinesteraza-O-CO-NH-CH}_3$$

$$\text{Acetilcolinesteraza-O-CO-NH-CH}_3 + \text{HOH} \rightarrow \text{Acetilcolinesteraza-OH} + \text{HOOC-NH-CH}_3$$

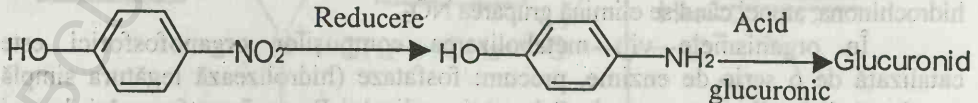
Compuşii carbamici perturbă de asemenea sistemul endocrin, fiind embriotoxici şi mutageni.

Aspecte biotehnologice. În sol, există anumite microorganisme care au capacitatea de a descompune unii derivaţi carbamici. Dintre acestea, Actinomicetele sunt cele mai active în hidrolizarea legăturii carbamice. Agrobacterium sp., Achromobacter sp, Pseudomonas striata sunt câteva dintre microorganismele implicate în metabolizarea carbamaţilor. S-a constatat că produşii carbamici inhibă activitatea bacteriilor nitrificatoare, când se găsesc în cantităţi mari. În amestec cu extrase de Bacillus thuringiensis, activitatea lor pesticidă creşte, manifestându-se un efect sinergic.

d. Metabolizarea compuşilor organofosforici. Acest tip de compuşi se pot biodegrada cel mai uşor prin hidroliză şi oxidare, dar şi prin reducere. Supus hidrolizei, **parationul** se scindează în acid dietil-tiofosforic şi p-nitrofenol. p-Nitrofenolul se poate reduce la p-aminofenol, care se conjugă cu acidul glucuronic şi poate fi eliminat prin urină.

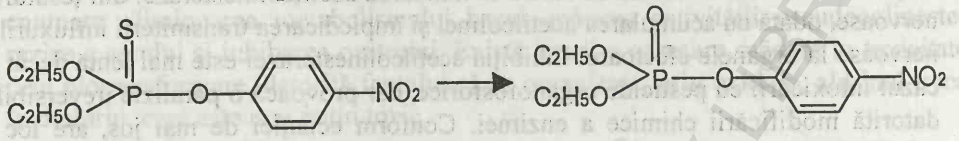


Paration — Acid dietil-tiofosforic — p-nitro-fenol

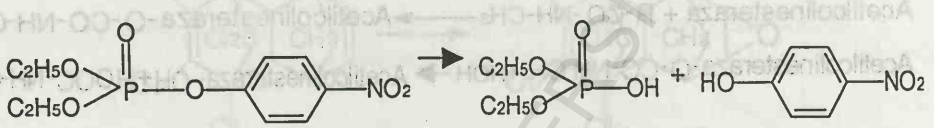


p-nitrofenol — p-aminofenol

La fel de probabilă este și reacția de oxidare a parationului, prin care acesta se transformă în paraoxon. Paraoxonul este mai toxic decât parationul, altfel spus, prin această reacție acest organofosforic se bioactivează. Paraoxonul poate fi hidrolizat, cu formare de p-nitrofenol.

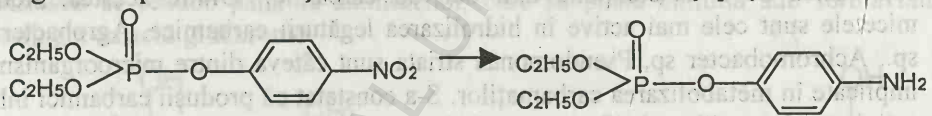


Paration Paraoxon

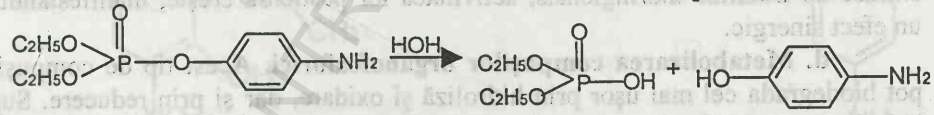


Paraoxon Acid dietil-fosforic p-nitro-fenol

Prin reducere, parationul trece în amino-paration. Amino-parationul se biodegradează prin hidroliză și se formează acid dietil-fosforic și p-aminofenol.



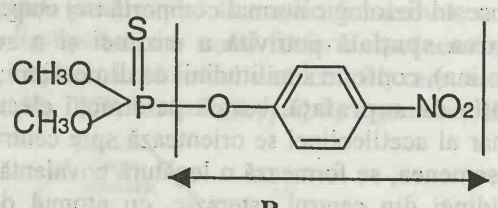
Paration Amino-paration



Amino-paration Acid dietil-fosforic p-Aminofenol

Acidul dietil-fosforic suferă o acumulare în organism. Practic, p-nitrofenolul obținut din hidroliza paraoxonului se reduce tot la p-aminofenol, care se elimină prin conjugare cu acid glucuronic. În organismele vii au loc de asemenea, o serie de reacții secundare care transformă atât p-nitrofenolul, cât și p-aminofenolul. Spre exemplu, p-aminofenolul poate polimeriza sau se poate scinda ciclul aromatic, cu formare de CO_2. Din p-nitrofenol, prin hidroxilarea ciclului se poate forma nitro-pirocatechina sau hidrochinona, atunci când se elimină gruparea NO_2.

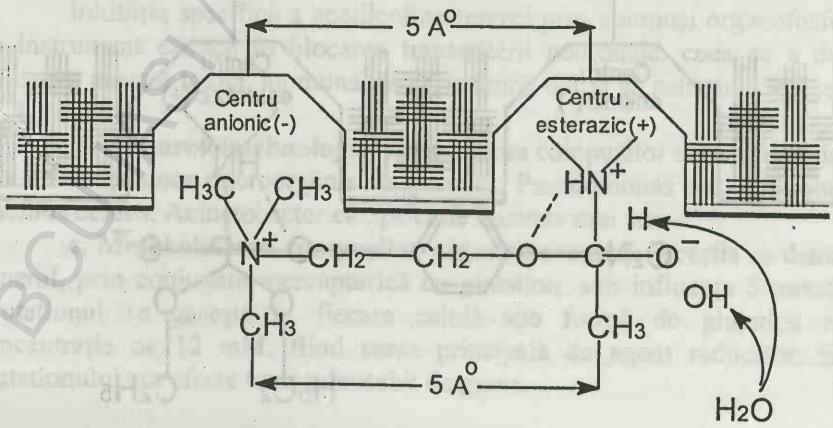
În organismele vii, metabolizarea compușilor organofosforici este catalizată de o serie de enzime, precum: fosfataze (hidrolizează legătura simplă covalentă dintre P și un atom de O legat de radicalul R, conform formulei de mai jos), carboxiesteraze (hidrolizează legături esterice –O-CO-), amidaze (hidrolizează legături –CO-N=), oxidaze (oxidări, N-alchilări), reductaze (dezalchilări) etc.



Compuşii organofosforici sunt deosebit de toxici pentru organismele cu sânge cald, deoarece inhibă acetilcolinesteraza în sinapsele colinergice ale sistemului nervos central şi ale legăturilor periferice musculare, provocând paralizie. Ca urmare, se acumulează acetilcolină în ţesuturi. Au capacitatea de a inhiba şi o serie de alte enzime importante, precum: tripsina, chimotripsina, lipaze, esteraze, catalaze, peroxidaze etc. În doze subletale se acumulează provocând intoxicaţii cronice.

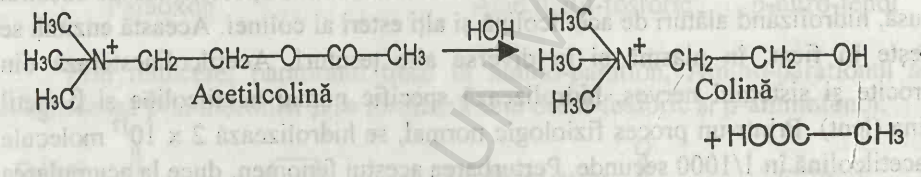
Mecanismul blocării acetilcolinesterazei. Colinesterazele sunt enzime care catalizează hidroliza acetilcolinei. Pseudoesteraza are specificitate de substrat redusă, hidrolizând alături de acetilcolină şi alţi esteri ai colinei. Această enzimă se găseşte în ficat, în plasmă şi în diverse alte ţesuturi. Acetilcolinesteraza din eritrocite şi sistemul nervos, hidrolizează specific numai acetilcolina şi β-metil colina (lent). Printr-un proces fiziologic normal, se hidrolizează 2 x 10^{12} molecule de acetilcolină în 1/1000 secunde. Perturbarea acestui fenomen, duce la acumularea colinei în zona terminală a nervilor, cu apariţia unei activităţi parasimpatice excesive, convulsii, tahicardie, asfixie, moarte.

Cataliza enzimatică presupune interacţionarea acetilcolinesterazei cu acetilcolina, pe baza posibilităţii inserării acetilcolinei în regiunile active ale enzimei. Acetilcolinesteraza prezintă cei doi centri activi pe care-i posedă (un centru anionic şi un centru cationic, numit esterazic, format de gruparea -HN- din ciclul histidinic), la o distanţă de 5 A^0 unul de celălalt. Acetilcolina are practic aceeaşi dimensiune, inserându-se cu două dintre grupările metil ale azotului cuaternar în centrul anionic, şi cu funcţiunea acetil R–COO^- în centrul esterazic.

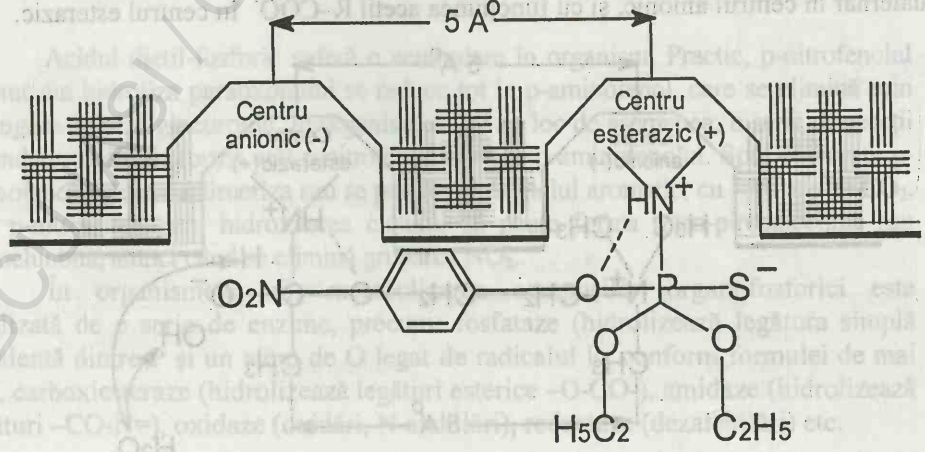


Practic, procesul fiziologic normal comportă trei etape:

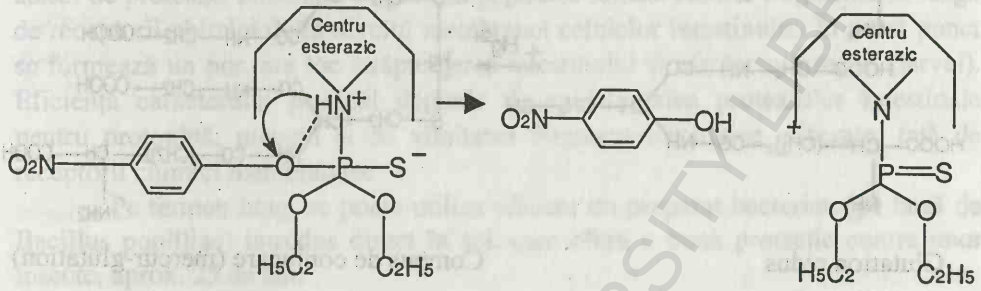
- **orientarea spațială** potrivită a enzimei și a substratului (respectiv acetilcolina), conform similitudinii de dimensiuni;
- **adsorbția de suprafață**, bazată pe atracții electrice, astfel că azotul cuaternar al acetilcolinei se orientează spre centrul anionic al enzimei și de asemenea, se formează o legătură covalentă între atomul de azot al histidinei din centrul esterazic, cu atomul de carbon al grupării acetil; totodată, se stabilesc punți de hidrogen între atomul de hidrogen de la gruparea -HN- a histidinei cu un atom de oxigen din acetil;
- **hidroliza propriu-zisă** are loc cu ajutorul apei din mediu, când se formează colină și acid acetic. Atomul de hidrogen histidinic trece pe radicalul de colină, eliberând colina, locul său fiind ocupat de un atom de hidrogen din apă; pe restul acetil se fixează gruparea -OH a apei, desfăcându-se legătura covalentă dintre carbon și azotul histidinic, cu eliberare de acid acetic.



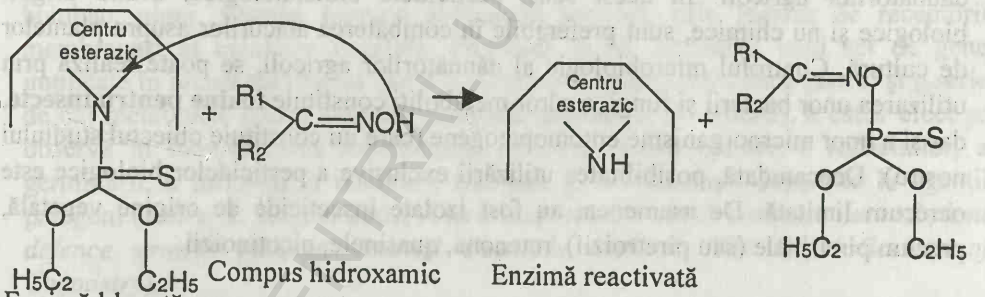
Compușii organofosforici își datorează toxicitatea excesivă tocmai faptului că molecula parationului spre exemplu, are dimensiuni comparabile cu acetilcolina, iar gruparea fosforică manifestă o afinitate față de centrul esterazic al acetilcolinesterazei. Astfel, se produce o competiție între organofosforice și substratul natural al enzimei, care este acetilcolina. Se formează o legătură covalentă între fosfor și azotul histidinic, extrem de puternică și greu de desfăcut. De asemenea, se stabilește o legătură de hidrogen între atomul de hidrogen histidinic și un atom de oxigen al parationului, atașat restului fosforic.



Ulterior legării parationului la acetilcolinesterază, are loc un proces, prin care se elimină p-nitrofenolul, dar restul fosforic rămâne ataşat de enzimă printr-o legătură covalentă, impiedicând accesul acetilcolinei, care se acumulează, după cum s-a amintit (*Cotrău, M., 1978,Toxicologie, principii generale, Ed. Junimea, Iaşi*).



Dacă legătura dintre organofosforic şi enzimă este recentă, ea se poate scinda cu compuşi hidroxamici, care au afinitate pentru restul fosforic. Acesta din urmă eliberează enzima, care devine aptă să adsoarbă la suprafaţă şi să hidrolizeze acetilcolina. Un blocaj mai vechi al enzimei cu organofosforic, o inactivează practic definitiv.



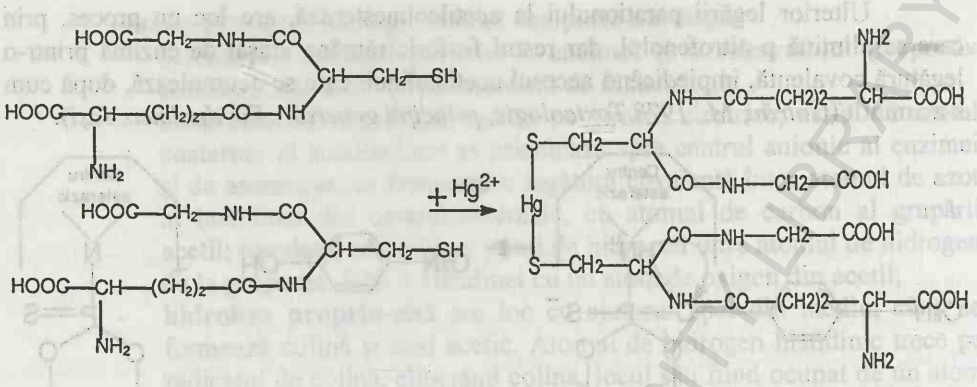
Enzimă blocată Compus hidroxamic Enzimă reactivată Rest fosforic eliminat

Inhibiţia specifică a acetilcolinesterazei prin compuşi organofosforici este un instrument eficace în blocarea transmiterii neuronale, ceea ce a determinat utilizarea acestor toxici, nu numai în agricultură, dar şi ca substanţe toxice de luptă (STL).

Depoluare biotehnologică. Degradarea compuşilor organofosforici se face sub influenţa unor microorganisme, precum: Pseudomonas sp., Arthrobacter sp., Bacillus cereus, Acinetobacter etc. pe căile ilustrate mai sus.

e. Metabolizarea compuşilor organomercurici. Aceştia se detoxifică, în general, prin conjugare mercapturică cu glutation, sub influenţa S-transferazelor. Glutationul se găseşte în fiecare celulă sub formă de glutation redus, în concentraţie de 12 mM, fiind sursa principală de agent reducător. Epuizarea glutationului are efecte toxice deosebit de grave.

CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Glutation redus Compus de conjugare (mercur-glutation)

15.2.1.3. Pesticide biotehnologice (biopesticide)

Toxicitatea extremă a pesticidelor de sinteză, caracterul lor îndelungat remanent, poluarea mediului înconjurător în dezacord cu principiile de bază a ecologiei a determinat căutarea unor soluții, pentru rezolvarea problemei dăunătorilor agricoli. În acest sens, pesticidele biotehnologice, având origini biologice şi nu chimice, sunt preferabile în combaterea atacurilor asupra plantelor de cultură. Controlul microbiologic al dăunătorilor agricoli, se poate realiza prin utilizarea unor bacterii şi fungi, a căror metaboliți constituie **toxine pentru insecte**, dar şi a unor microorganisme entomopatogene (care nu constituie obiectul studiului nostru). Deocamdată, posibilitatea utilizării exclusive a pesticidelor biologice este oarecum limitată. De asemenea, au fost izolate insecticide de origine vegetală, precum piretrinele (sau piretroizii), rotenona, quasinele, nicotinoizii.

15.2.1.3.1. Pesticide biotehnologice produse de bacterii

O serie de bacterii care sporulează, numite sporogene cristalifere, precum cele din genul Bacillus (B. thuringiensis, B. popilliae, B. sphericus, B. dendronimus), produc **cristale proteice**, cu rol de insecticid care paralizează şi străpung intestinul insectelor. Aceste cristale se comportă ca un insecticid de ingestie foarte eficient.

Cristalul parasporal, apare practic odată cu sporul (B. thuringiensis) şi reprezintă o **delta-endotoxină** termolabilă (*Heimpel, 1967*). Exceptând acest cristal, au fost identificate şi alte substanțe toxice, precum: **alfa-exotoxina** (fosfolipază C), **beta-exotoxina** termostabilă şi **gama-exotoxina**. Cristalul proteic amintit, cristalizează în diferite forme: cubic, hexaedric, octaedric etc. Nu se solubilizează în apă sau solvenți organici, dar se dizolvă în mediu alcalin, fapt ce-i conferă toxicitate. În mediu alcalin al intestinului insectelor, toxina proteică este atacată de protează, eliberând fracții toxice.

Funcție de secvența fracțiilor se disting mai multe clase proteice: Cry I (patogeni pentru lepidoptere), Cry II (patogeni pentru lepidoptere și diptere), Cry III (patogeni pentru coleoptere) și Cry IV (patogeni pentru diptere). Practic, cristalul proteic sau **protoxina**, se dizolvă în mediu alcalin al intestinului. Este atacat de proteaze, eliberând fragmente peptidice toxice. Aceste fragmente se leagă de receptorii chimici de la nivelul membranei celulelor intestinului. În acest punct se formează un por, are loc străpungerea intestinului și afectarea insectei (larvei). Eficiența caracterului pesticid depinde de specificitatea proteazelor intestinale pentru protoxină, precum și de afinitatea fragmentelor toxice eliberate, față de receptorii chimici membranari.

Pe termen lung, se poate utiliza eficient un preparat bacterian (pe bază de Bacillus popilliae) introdus direct în sol, care oferă o bună protecție contra unor insecte, aprox. 25 de ani.

Relativ recent (1992) s-a descoperit o nouă substanță produsă de bacterii, numită **harpină**, considerată biopesticid. Aceasta activează sistemul imunitar al plantelor și stimulează creșterea. Harpina este o proteină extracelulară acidă, fiind formată din 403 resturi de aminoacizi, este bogată în glicină, este termostabilă și are o greutate de 40 kD. Prezintă o toxicitate moderată. Se utilizează pentru protecția unei game variate de plante, precum: grâu, orez, citrice, castraveți, bumbac, piper. Practic, harpina acționează indirect, prin legarea de receptorii membranari ai celulelor vegetale. Provoacă astfel, activarea unui set de gene implicate în rezistența plantei (SAR – systemic acquired resistance genes) și o serie de căi metabolice (calea acidului jasmonic dependent de etilenă), a căror efect se observă în intensificarea fotosintezei, creșterea masei plantei, a rădăcinilor, a germinării, a înfloririi, a maturării fructelor și a rezistenței deosebite la agenții patogeni (*Jones, J., August 2001, A new biopesticide which activates natural plant defence growth systems, Journal Pesticide Outlook, The Royal Society of Chemistry*).

15.2.1.3.2. Pesticide biotehnologice produse de fungi

Fungii din genul Aspergillus și Penicillium, cu toate că sunt saprofiți, prezintă la rândul lor proprietăți pesticide, prin produși ai metabolismului lor, anume micotoxinele. **Aflatoxinele** (produse de Aspergillus sp.) sunt toxice pentru diferite insecte: Heliothis virescens, Spodoptera frugiperda, Ostrinia nubilalis, Sitophilus zeamais, Drosophila melanogaster etc. Provoacă mutații genetice și inhibă spermatogeneza. Micotoxinele afectează nu numai insectele, dar afectează și bacteriile. Astfel, Bacillus thuringiensis este afectat de aflatoxine, **patulină** (sintetizată de Penicillium patulum) și **griseofulvină** (sintetizată de Penicillium griseofulvum). În acest sens, Bacillus thuringiensis poate fi utilizat în biotehnologii pentru depistarea micotoxinelor din alimente.

Alți fungi producători de micotoxine sunt speciile de Fusarium. Spre exemplu, Fusarium solani sintetizează **acid fusaric** și o serie de **pigmenți** cu activitate insecticidă.

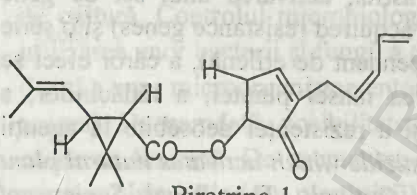
Fungi precum Trichotecium roseum produc antibiotice toxice, cunoscute fiind **trichotecenele** (formulele micotoxinelor se regăsesc în vol I al Tratatului de Biotehnologie).

În afară de caracterul insecticid al unor substanțe toxice extrase din fungi, s-au izolat micotoxine cu **efect erbicid**. Spre exemplu, Fusarium moniliforme emite **moniliformina** și **herbplanina**, ambele fiind utilizate cu succes ca erbicide.

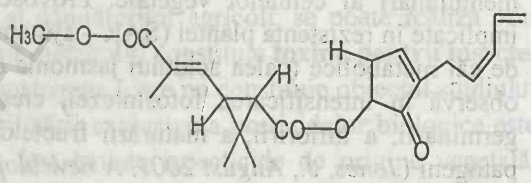
În acest context, ingineria genetică poate concepe microorganisme înzestrate cu caracteristici pesticide selective și biopreparate, având un larg câmp de acțiune.

15.2.1.3.3. Pesticide biotehnologice de natură vegetală

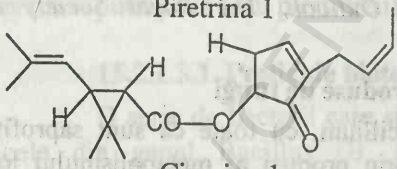
Se cunosc aproximativ 2000 de plante cu acțiune insecticidă. **Piretrinele**, extrase din plante (produse actualmente și prin sinteză, numite piretroizi) sunt insecticide de contact. Au fost izolate din inflorescențele de Pyretrum cinerariae și Chrysantemum cinerariae folium (conține cea mai mare cantitate de piretrine, 0,7-3 %, un amestec de 6 esteri). S-au izolat inițial, piretrina I (lichidă, solubilă în solvenți organici) $C_{21}H_{20}O_3$ și piretrina II (cristalizată, solubilă în apă) $C_{22}H_{28}O_5$, care prezentau proprietăți insecticide. Ulterior, s-a constatat că piretrinele constituie de fapt amestecuri de piretrină 1, cinerină 1 și jasmolină 1, respectiv piretrină 2, cinerină 2 și jasmolină 2 (acestea din urmă fiind esterii metilici ai primelor).



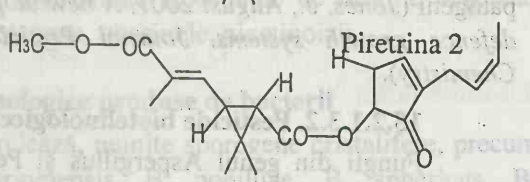
Piretrina 1



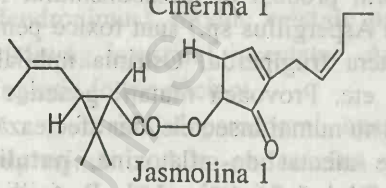
Piretrina 2



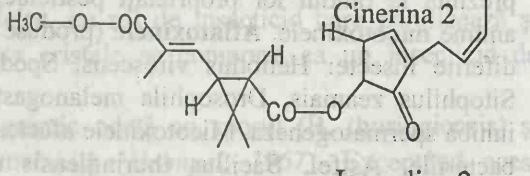
Cinerina 1



Cinerina 2



Jasmolina 1

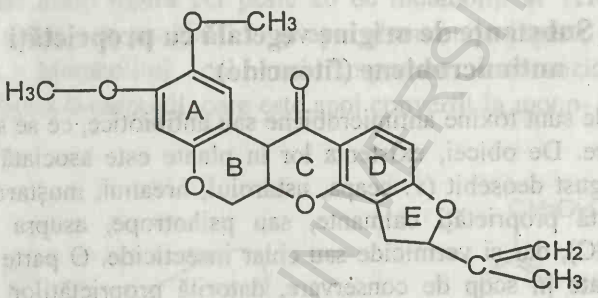


Jasmolina 2

Piretrinele atacă sistemul nervos, ducând la paralizie. Toxicitatea piretrinelor diferă pentru insecte, nefiind toxice pentru om. Sunt mai eficiente decât insecticidele selective sintetice și sunt repelente foarte active împotriva țânțarilor. Piretrina I diluată 1/10000, distruge insectele în 10 minute, iar piretrina II în 40 minute, fiind în consecință mai puțin toxică. Produse pe bază de piretrine sunt: Decis, Permetrină, Decametrin, Cypermetrin etc. Nu s-au constatat efecte

carcinogene ale acestui bioinsecticid asupra şoarecilor de experienţă. Este unul dintre cele mai utilizate biopesticide în "agricultura organică" (*Glynne-Jones, A., October 2001,Pyrethrum, a unique biopesticide, Journal Pesticide Outlook, The Royal Society of Chemistry*).

Rotenona $C_{23}H_{26}O_6$ se extrage din rădăcinile unor leguminoase exotice: Derris eliptica, Lonchocarpus vicon şi Tephrasia vagelii. Este un insecticid de contact şi de ingestie, nefiind toxică pentru om. Acţionează asupra sistemului nervos. Nu este solubilă în apă, ci în solvenţi organici. La lumină UV se oxidează uşor şi îşi pierde toxicitatea. Are în consecinţă, efect reducător asupra citocromului b. Forma activă a rotenonei implică aşezarea în acelaşi plan (cis) a inelelor B şi C. Modificările de izomerie micşorează sau anulează efectul insecticid.



Rotenona

Metabolizarea rotenonei conduce la obţinerea a patru metaboliţi, dintre care dehidro-dehidroxirotenona are efecte similare rotenonei. Prin hidroxilare enzimatică, rotenona se transformă în rotenolon I şi II (*Davidescu, D şi colab, 1992, Protecţia chimică în agricultură VII, Ed. Acad. Române*).

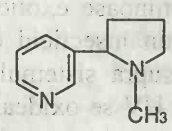
Studii recente au arătat că rotenona inhibă respiraţia mitocondrială şi producerea de ATP, generând diferite specii de oxigen reactive. Acestea pot interacţiona cu ADN, ARN, cu proteinele, producând lezarea celulelor şi moarte. A fost demonstrat efectul genotoxic, clastogenic, prin evaluarea aberaţiilor cromozomiale induse de rotenonă. la nivelul limfocitelor umane (*Patrícia Danielle Lima de Lima, Elizabeth Sumi Yamada, Edmar Tavares da Costa, Dec. 2005, Genotoxic effects of rotenone on cultured lymphocytes, On line Journal Genetic and Molecular Research*).

Quasinele sunt eteri metilici ai acidului quasic ($C_{30}H_{38}O_{10}$. H_2O). Se extrag din coaja arborelui Quassia amara din America. Se solubilizează greu în apă, sunt toxice pentru insecte şi chiar pentru om. Toxicul pătrunde prin traheea insectelor pe care le imobilizează (*Ioanid, N., I., Toxicologie, 1965, Ed. Didact. şi Pedag, Bucureşti*).

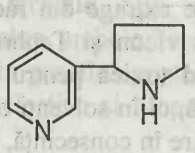
Nicotinoizii sunt alcaloizi cu azot, extraşi din frunzele de tutun. Trei dintre aceştia: **nicotina, nornicotina** şi **anabasina** prezintă o acţiune insecticidă eficientă (afide, tripşi).

Nicotina are un efect similar cu cel al acetilcolinei, când aceasta se acumulează în sinapsele neuronilor, provocând contracţii, convulsii, paralizie. Nicotina este toxică pentru majoritatea vertebratelor (slăbiciune, salivaţie, vomă,

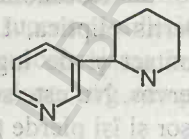
convulsii, întreruperea respirației). Metabolizarea la insecte, transformă nicotina în cotinină, în principal. La vertebrate, metabolizarea se face în ficat și apar următorii compuși: cotinină, dimetil-nicotină, dimetil-cotinină, acid piridil-acetic.



Nicotină



Nornicotină

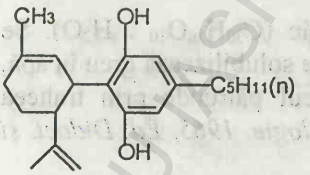


Anabasină

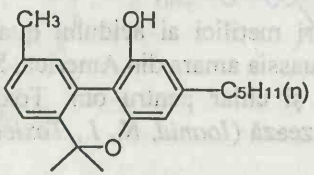
15.2.1.4. Substanțe de origine vegetală cu proprietăți antimicrobiene (fitoncide)

Fitoncidele sunt toxine antimicrobiene sau antibiotice, ce se sintetizează în plantele superioare. De obicei, existența lor în plante este asociată cu un miros puternic, sau un gust deosebit (v. ceapa, usturoiul, hreanul, muștarul etc). Multe dintre ele prezintă proprietăți calmante, sau psihotrope, asupra organismelor superioare (v. THC), dar și vermicide sau chiar insecticide. O parte dintre aceste plante sunt utilizate în scop de conservare, datorită proprietăților dezinfectante (hreanul, usturoiul, muștarul).

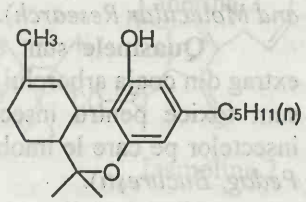
Substanțe antimicrobiene din cânepă. În ultimele două decenii s-a acordat o atenție deosebită toxicologiei unor substanțe extrase din Cannabis sativa (un amestec complex de compuși chimici numiți canabinoide). Au fost izolate următoarele substanțe: canabinol, canabidiol, tetrahidrocanabinol (THC), quebrachitol (inozitol-monometil-eter), 1-metil-4-izopropil-benzen și canabol (caracter fenolic, cu formulă neelucidată încă). S-au mai izolat și alte substanțe în cantități mici, fiind studiate și aspectele cantitative suferite de modificări ale carotenilor la această plantă. Cannabis potențează efectul hipnotic al barbituricelor. Trei dintre compușii menționați mai sus, anume: canabinolul, canabidiolul și tetrahidrocanabinolul sunt de interes farmacologic, ultimul având o comportare asemănătoare haşişului.



Canabidiol



Canabinol

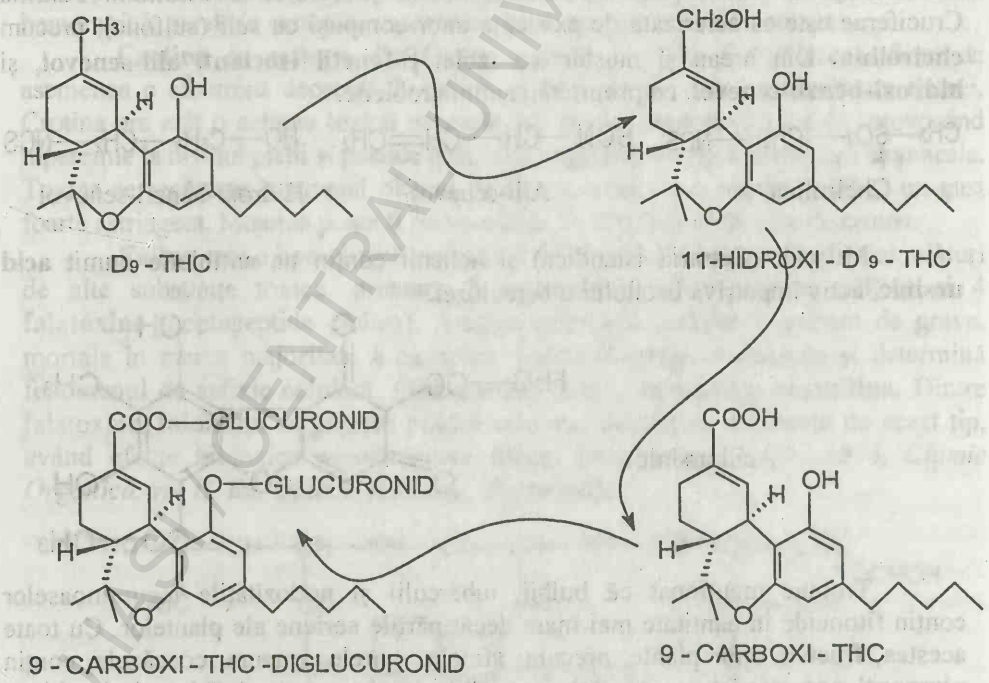


Tetrahidrocanabinol

Acești trei compuși au fost sintetizați în laborator și s-a constatat că exercită o acțiune antibiotică (bactericidă) asupra unor microorganisme, precum Staphylococcus aureus, Staphylococcus haemophylus, Staphylococcus pyogenes, Streptococcus viridans, Bacillus anthracis etc.

Δ-9-Tetrahidrocanabinol (THC) este responsabilul principal pentru efectele psihice ale compuşilor pe bază de cannabis. În cele mai multe cazuri, canabisul este inhalat prin fumat şi doar ocazional este consumat pe cale orală. THC este metabolizat în cea mai mare proporţie de către organismul uman, cercetările efectuate decelând doar o proporţie de 1 % THC nemodificat, în urină. Atunci când este inhalat, metabolizarea iniţială a THC are loc în plămân. După aproximativ 72 de ore de la inhalare, 50 % din cantitatea iniţială de THC este excretată, iar 50 % este distribuită în tot corpul şi este absorbită la nivelul ţesuturilor grase, de unde va fi excretată după câteva zile. Excreţia se realizează prin urină (25 %) şi fecale (65 %).

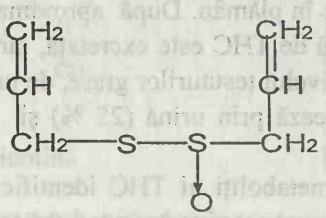
Cei mai mulţi dintre cei peste 20 de metaboliţi ai THC identificaţi, se formează prin oxidare în poziţia C 11 şi apoi glucuronconjugare, conform schemei de mai jos. Metabolitul cel mai important este acidul 11-nor-Δ-9-tetrahidrocanabinol-9-carboxil, care este apoi convertit la mono- şi di-glucuronide prin conjugare.



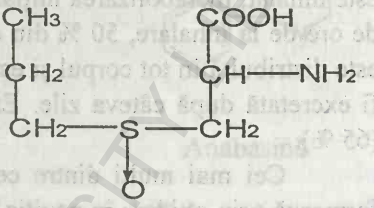
Concentraţia THC în plasmă scade rapid ca urmare a metabolizării şi stocării tisulare, metaboliţii săi putând fi puşi în evidenţă în urină într-o perioadă de 1 – 3 zile din momentul consumării, funcţie de metoda de investigare utilizată (*Recommended methods for the detection and assay of drugs, in biological specimens, 1990, Manual for use by national laboratories, Madrid*).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Alicina este fitoncidul din usturoi (Allium sativum). Este o substanță volatilă activă contra bacilului difteric, bacteriei holerei sau a unor stafilococi. **Dihidroaliina** este fitoncidul din ceapă. Din morcovi s-au izolat: acidul benzoic, acidul p-hidroxibenzoic, acidul vanilic, acidul ferulic, acidul clorogenic și acidul cafeic, care au proprietăți bacteriostatice și bactericide.

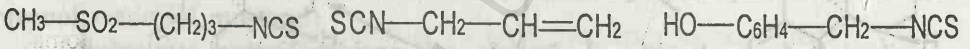


Alicina



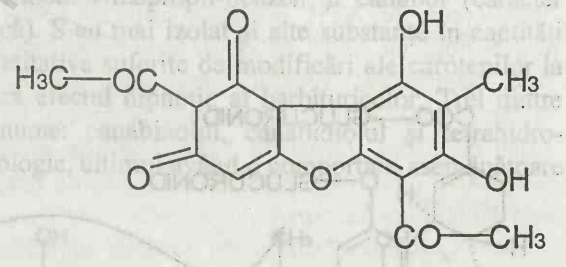
Dihidroaliina

Cerealele beneficiază de asemenea, de mijloace de protecție antimicrobiană. Astfel, grâul, porumbul și secara conțin **glicozizi benzoxazinici**, care prin hidroliză devin toxici pentru Fusarium nivale și Sclerotina trifolium. Familia Cruciferae este caracterizată de existența unor compuși cu sulf (sulfone), precum **cheirolina.** Din hrean și muștar s-a izolat **β-fenetil izociant, alil-senevol,** și **hidroxi-benzil-senevol**, cu proprietăți antimicrobiene.



Cheirolina Alil-senevol Hidroxi-benzil-senevol

Mușchii (Cetraria islandica) și lichenii conțin un antibiotic numit **acid ursinic**, activ împotriva bacilului tuberculozei.



Acid ursinic

Trebuie menționat că bulbii, tuberculii și nodozitățile leguminoaselor conțin fitoncide în cantitate mai mare decât părțile aeriene ale plantelor. Cu toate acestea, fructele unor plante, precum: afinele, murele, zmeura, coacăzele, conțin **pigmenți antocianici** în cantități apreciabile, cu bune proprietăți antimicrobiene *(Neamțu, G., 1997, Biochimie alimentară, Ed. Ceres, București).*

15.2.1.5. Fitotoxine

Fitotoxinele sunt o clasă de substanțe cu însușiri antigenice, de origine vegetală (sau fungică, dacă provin din ciuperci), ce provoacă reacții de răspuns din

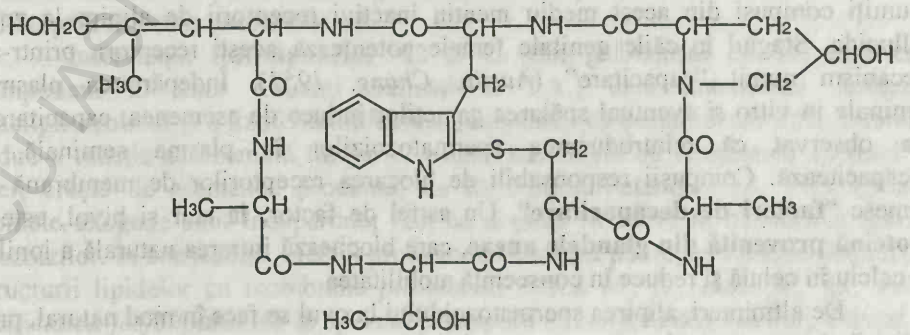
partea organismelor în care au pătruns, în sensul formării anticorpilor. Ele sunt numite şi **toxalbumine**, printre care amintim: ricina, crotina, falina, abrina, curcina etc.

Ricina, o proteină vegetală, este o toxalbumină neutră, extrasă din Ricinus communis, şi nu este atacată de enzimele proteolitice. Ricina este extrem de toxică, doza mortală pentru un om adult fiind de 0,03-0,10 g. Toxicitatea ei creşte în funcţie de modul de administrare, crescând de 500 de ori dacă este injectată intravenos, intraperitoneal, sau subcutanat. La nivelul stomacului ricina este atacată şi distrusă parţial de proteaze, dar cea mai mare parte se resoarbe. După 6 ore se constată eliminarea ei prin intestin, unde îşi păstrează în continuare toxicitatea. Se constată apariţia unei imunizări la ricină, în situaţia în care se administrează doze crescânde pe cale gastro-intestinală. Serul animalelor imunizate devine ser antitoxic pentru alte organisme similare.

Ricina este un toxic vascular (asemănător veninului de şarpe), dar şi al sângelui, provocând hemoliza şi aglutinarea eritrocitelor. Uleiul de ricin nu conţine ricină, deoarece aceasta nu se solubilizează în ulei. Ricinul se găseşte în special în seminţele de ricin, care sunt foarte toxice (5 seminţe pentru un copil şi 20 pentru un adult, provoacă moartea). Aspectele clinice ale intoxicaţiei sunt diverse: gastroenterită hemoragică, paralizia centrului vasomotor, icter, anurie, convulsii, colaps.

Crotina se extrage din Croton tiglium (familia Euforbiacee), fiind de asemenea o albumină deosebit de toxică, a cărei acţiune este asemănătoare ricinei. Crotina are atât o acţiune toxică generală, cât şi o acţiune toxică locală, provocând hiperemie la nivelul pielii şi pustule purulente. Ingerată, produce hemoragii stomacale. Toxina se regăseşte la nivelul oleului de croton, care are o reacţie acidă şi un gust foarte astringent. Moartea poate fi provocată de 15-20 picături de oleu de croton.

Falina este o hemolizină sintetizată de ciuperca Amanita phalloides, alături de alte substanţe toxice, precum: 5 **amatotoxine** (octopeptide ciclice) şi 4 **falatoxine** (heptapeptide ciclice). Acestea provoacă intoxicaţii extrem de grave, mortale în marea majoritate a cazurilor. Falina distruge eritrocitele şi determină fenomenul de asfixie celulară. Dintre amatotoxine, menţionăm **amanilina.** Dintre falatoxine, **faloidina** se găseşte printre cele mai cunoscute substanţe de acest tip, având efecte biologice asemănătoare falinei (*Nenițescu, C., D., 1974, Chimie Organică, vol II, Ed. Didact. şi Pedag., Bucureşti*).



Faloidină

Abrina se găseşte în seminţele de Abrus precatorius (leguminoasă). Zdrobirea seminţelor şi macerarea lor cu apă duce la obţinerea unui venin în care anumite triburi îşi înmuiau vârfurile săgeţilor. Abrina manifestă acţiune toxică generală asemănătoare ricinei, dar şi o acţiune toxică locală iritantă.

15.2.2. Aspecte toxice asociate biotehnologiilor zootehnice

15.2.2.1. Consecinţe toxice ale conservării celulelor animale în biotehnologia reproducţiei

Acţiunea nocivă, toxică, ce lezează anumite celule animale, este exemplificată cel mai bine prin efectul diluanţilor şi al congelării asupra materialului seminal, respectiv asupra spermatozoizilor, în tehnica însămânţărilor artificiale I.A. (*Tamba-Berehoiu R., Ristea P., Şonea Al., Stoica A., Matei M., 1994, Cercetări privind influenţa diluanţilor şi ai unor parametri spermatici asupra capacităţii de congelare a materialului seminal, la tăuraşii în testare, Lucr. Simp."Ameliorarea, reproducţia şi aprecierea masculilor reproducători după calitatea descendenţei", Chişinău, p. 50*).

Spermatozoidul este o celulă flagelată descoperită în anul 1677 de studentul Hamm din Leida în materialul seminal al omului şi a fost pusă în evidenţă de Leuwenhoeck în 1679 în sperma animalelor. Fixarea spermatozoizilor de glicoproteinele zonei pellucida a ovulului se face prin anumiţi receptori de membrană, care pot fi enzime sau simple proteine şi care se structurează pe parcursul tranzitului epididimar. Spre exemplu, la şoarece funcţionează ca receptor spermatic de membrană galactozil-transferaza. În consecinţă, orice substanţă, provenită din diluanţii materialului seminal, care afectează receptorii spermatici de membrană blocându-i, îşi manifestă nocivitatea şi toxicitatea (*Bogdan Al., Târnovean I., Salanţiu D., 1984, Fertilitatea, natalitatea şi prolificitatea în Zootehnie, 1984, Ed. Dacia Cluj-Napoca, vol. 1*).

Practic, în plasma seminală spermatozoizii nu sunt fecundanţi, deoarece anumiţi compuşi din acest mediu menţin inactivi receptorii de alipire la zona pellucida. Stagiul în căile genitale femele potenţează aceşti receptori, printr-un mecanism numit "capacitare" (*Austin, Chang, 1951*). Îndepărtarea plasmei seminale in vitro şi eventual spălarea gameţilor induce de asemenea, capacitarea. S-a observat că reintroducerea spermatozoizilor în plasma seminală, îi decapacitează. Compuşii responsabili de blocarea receptorilor de membrană se numesc "**factori de decapacitare**". Un astfel de factor, la taur şi bivol, este o **proteină provenită din glandele anexe**, care blochează intrarea naturală a ionilor de calciu în celulă şi reduce în consecinţă mobilitatea.

De altminteri, alipirea spermatozoidului la ovul se face în mod natural, prin redistribuirea proteinelor ataşate membranei capului, care migrează la partea ecuatorială postacrozomală, lăsând regiuni "curate" ale membranei plasmatice şi

acrozomale (figura 15.4). Totodată, **proteinele cu mase mari** din plasma seminală sau din mediul de diluție, care se pot atașa receptorilor membranari ai flagelului, stânjenesc mișcările cozii spermatozoidului și micșorează mobilitatea acestuia (*Crabo B., G., Larsen R., E., Zimmerman K., J., 1980, Binding of seminal plasma proteins to boar spermatozoa, The 9th International Congress on Animal Reproduction, Madrid, vol. 3, p.269*).

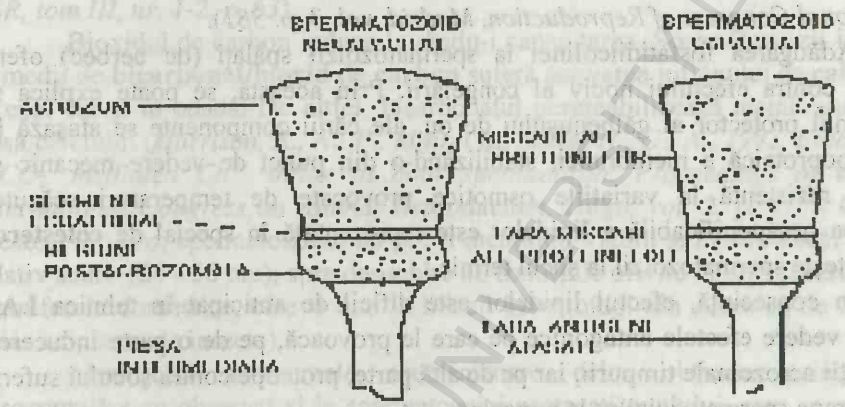


Figura 15.4. Migrarea proteinelor atașate la membrana spermatozoidului în timpul capacitării

Unele dintre fenomenele ce au loc la nivelul membranei spermatozoidului în timpul capacitării se observă și în timpul expunerii la temperaturi foarte scăzute (în special întreruperea "hainei proteice"), ceea ce pune problema dacă nu cumva congelarea poate fi privită ca o maturare similară cu cea din tractul genital femel, respectiv o precapacitare care induce o reacție acrozomală prematură (reacția acrozomală fiziologică este imediat ulterioară capacitării și constă în ruperea acrozomului și eliberarea enzimelor acrozomale cu rol în procesul de fecundare).

În procesul de capacitare sunt implicate și anumite categorii de **lipide**, astfel că membrana plasmatică a spermatozoidului pierde colesterol și demosterol sulfat, prin acțiunea unor sulfataze.

Intervenția **fosfolipazelor A2 și C** (din gălbenușul de ou, care este component al unor diluanți utilizați în I.A.) care antrenează formarea diacilglicerolului și a lizofosfatidilcolinei, cunoscuți ca destabilizatori membranari, induc o reacție acrozomală timpurie și nedorită. Odată cu congelarea spermei de vier, crește de asemenea procentul de lizofosfatidil-etanolamină. Prin spălare, lipidele exogene sunt îndepărtate, fără ca acestea să adere la membrana spermatozoizilor. În consecință, efectul protector se bazează pe imposibilitatea interacției structurii lipidelor cu membrana *plasmatică (Dyck M., K., Buhr M., M., 1994, Activitatea fosfolipazei A2 în sperma proaspătă și congelată a vierilor, Canad. J. of Anim. Sci., vol. 74, nr. 1, p. 59*).

Fosfolipidele spermei şi **plasmalogenul** în particular, joacă un important rol în metabolismul spermei, în special ca substrat pentru respiraţia endogenă (lipidele intracelulare) sau pentru respiraţia exogenă (lipidele din plasma seminală) şi conferă spermatozoizilor rezistenţă la şocurile termice. Fosfolipidele şi acizii graşi din spermă nu îşi modifică structura în condiţiile stresante ale şocului termic, dar s-a observat (la vier), că titrul total de fosfolipide scade pe seama pierderilor de fosfolipide intracelulare în plasma seminală (*White I., G., Chow P., Quinn P., J., 1980, Role of phospholipids in protecting spermatozoa from cold-shock, The 9th International Congress of Reproduction, Madrid, vol. 3, p. 381*).

Adăugarea fosfatidilcolinei la spermatozoizii spălaţi (de berbec) oferă protecţie contra efectului nociv al congelării. Prin aceasta, se poate explica şi mecanismul protector al gălbenuşului de ou, ale cărui componente se ataşază la partea lipoproteică a membranei, stabilizând-o din punct de vedere mecanic şi făcând-o rezistentă la variaţiile osmotice provocate de temperaturi scăzute. Fracţiunea nesaponificabilă a lipidelor este reprezentată în special de **colesterol** care ocroteşte spermatozoizii la şocul termic.

În consecinţă, efectul lipidelor este dificil de anticipat în tehnica I.A., având în vedere efectele antagonice pe care le provoacă, pe de o parte inducerea unei reacţii acrozomale timpurii, iar pe de altă parte, protecţie contra şocului suferit de membrana spermatozoizilor la congelare.

Alte componente necesare pentru protecţia gameţilor utilizaţi la I.A. sunt vitaminele. **Vitamina D** liposolubilă, protejează membranele spermatozoizilor şi le măreşte în consecinţă, rezistenţa la şocul termic.

Permeabilitatea deosebită a membranei, indusă de capacitare prematură, face ca anumite **componente cu greutate moleculară mică** (1000-2000 D) din mediu, să lezeze spermatozoidul prin penetrare (*Alsomai N., Vishwanath R., Shamun P., Molon P., C., 1994, Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull semen, Repr. Fert. and Develop., vol. 6:2, p. 165*).

Capacitarea *in vitro* se poate realiza prin obţinerea unor condiţii similare cu cele *in vivo*, anume: îndepărtarea plasmei seminale, adăugarea unor medii (Tyrode, Krebs-Ringer) care să corespundă secreţiilor tubare sau plasmei sangvine, prezenţa unui acceptor de colesterol, prezenţa heparinei care facilitează intrarea calciului în celule etc.

In vitro nu se poate creea mediul enzimatic necesar. Se crede că spermatozoizii contribuie ei înşişi la realizarea acestui mediu, datorită faptului că inducerea capacitării se face prin incubarea gameţilor în concentraţii mari (*Bugrov A., D., Sidashova S. A., 1992, The effect of dead spermatozoa on the survival rate of live spermatozoa in freshly diluted and frozen sperm of bulls and boars, Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, Haga, vol. 2, p. 1396*).

În timpul incubării, 10% din spermatozoizi eliberează conținutul acrozomal în mod spontan și concentrația enzimelor este suficientă pentru a provoca modificări membranare celorlalți 90 % (*Bonadonna T., 1978, Observații privind desprinderea zonei acrozomice la spermatozoizi, La Clinica Vet., 1978, vol. 101, nr.6, p. 152*). Acest fapt evidențiază o dată în plus, aspectul de comunicare între gameți, prin mediatori chimici. Prezența **tripsinei** accelerează de asemenea, capacitarea (*Buruiană L., M., Gluhovski N., 1956, Cercetări asupra activității tripsinice a spermei și semnificația ei, Studii și cercetări științifice, Acad. RSR, tom III, nr. 1-2, p. 63*).

Bioxidul de carbon induce la rându-i capacitarea. Spermatozoizii introduși în medii de **bicarbonat/bioxid de carbon** suferă activarea influxului de calciu, atât în cap, cât și în coadă. De altfel, bicarbonatul permeabilizează membranele și în lipsa calciului (*Harrison, R., A., P., Mairet B., Miller N., G., A., 1992, Bicarbonate / CO_2^- mediated Ca^{2+} influx in boar spermatozoa, Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, Haga, vol. 2, p. 475*). Cu toate acestea, *in vitro*, spermatozoizii nu pot fi menținuți viabili și mobili decât un timp relativ scurt (24 - 36 ore), spre deosebire de condițiile oferite *in vivo* (câteva zile la mamiferele domestice, câteva luni la liliecii hematofagi din America de Sud, sau chiar ani, la unele insecte).

Modificări acrozomale asemănătoare celor obținute prin reacție acrozomală s-au observat și la spermatozoizi neatașați ovulului, care se găsesc în plasma seminală sau în soluțiile de capacitare. Acest tip de reacții sunt "false reacții acrozomale", induse de modificări degenerative, ireversibile, urmate de imobilizarea, citoliza și moartea gameților (*Bedford, 1970*). Adevărata reacție acrozomală este observată numai la spermatozoizii viabili și este strict asociată cu capacitatea de fecundare.

Diluarea spermei este însoțită în general de modificări acrozomale. La taur, chiar la gameții mobili se observă dispariția corpului apical și umflarea acrozomului. Fenomenul este indus de **fructoză, glucoză și de amine** (diluant cu gălbenuș și tris, respectiv hidroxi-metil-amino-metan, care este o amină primară). Umflarea corpului apical este sesizabilă și la spermatozoizii din plasma seminală, care conține cantități fiziologice de fructoză (*Tamba-Berehoiu R., Ristea P., Stoica A., Șonea Al., Truță M., 1995, Influența unor diluanți asupra conservabilității spermei de vier, Lucr. Simp. "Probleme actuale ale tehnologiei producerii producției animaliere", Chișinău, p. 36*). Explicația este dată de scăderea pH-ului de la 6,6 - 6,7 la 5,7 - 6, în primele două ore de la ejaculare, prin acumularea acidului lactic, provenit din fructoliză. Capacitatea de tamponare (posibilitatea de a anihila modificările bruște de pH) a plasmei seminale este insuficientă în acest caz și pH-ul devine un prim factor perturbator, reglat de intensitatea fructolizei. Tamponarea pH-ului cu NaOH stopează modificările patologice, dar capacitatea de fecundare a spermatozoizilor care au evidențiat o falsă reacție acrozomală devine incertă (*Aalseth E., P., Saacke R., G., 1987, Alteration of the anterior acrosome of motile bovine spermatozoa by fructose and by hydrogen ion concentration, J. Reprod.Fert., 81, p.625*).

Lactatul este un important sistem reglator al pH-ului intern Diluarea de 40 de ori a materialului seminal produce un eflux puternic al lactatului şi creşterea concomitentă a pH-ului intern.

Presiunea osmotică este un parametru foarte important. Pentru păstrarea integrităţii membranelor spermatozoizilor, presiunea plasmei seminale este izotonică cu aceea a gameţilor şi este apropiată de presiunea osmotică a sângelui. Contribuţia la presiunea osmotică a spermei este realizată şi de electroliţii plasmei seminale, proveniţi din glandele anexe (concentraţia în K^+ este crescută faţă de plasma sanguină).

Experimente legate de presiunea osmotică evidenţiază faptul că membranele spermatozoizilor de taur sunt sensibile la osmolarităţi ridicate, iar spermatozoizii de berbec şi vier suferă leziuni chiar şi la o hipotonicitate uşoară. Primele afectate vor fi mitocondriile şi acrozomii. Mediile hipotonice produc o "îndoire" a celulei sexuale la punctul de conexiune cu coada. S-a constatat o corelaţie liniară între presiunea osmotică şi capacitatea de a rezista la frig. În tehnica I.A. este indicat ca diluanţii să aibă o presiune osmotică uşor ridicată. Torsionarea caracteristică a cozii ce apare în soluţii hipotonice este corelată cu aspectul turgescent al gameţilor şi se datorează faptului că schimburile de apă (în vederea egalizării presiunii) se fac cu ruperea membranei, cu toate că la microscop, spermatozoidul poate prezenta uneori membranele aparent neafectate (*Espinosa E., Solanilla E., Gil L., Josa A., Falceta M., V., Cruz J., I., 1992, The influence of temperature, osmolarity and dilution on the HOS test in bovine semen, Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, Haga, vol. 2, p. 435*).

Sărurile minerale asigură presiunea osmotică necesară integrităţii celulare şi contribuie la activarea reacţiilor enzimatice, datorită ionilor rezultaţi din disociere. În cantităţi mari se găsesc ioni ai metalelor alcaline (Na^+, K^+), alcalino-pământoase (Mg^{2+}, Ca^{2+}) şi ai metalelor grele (Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}). S-a amintit importanţa crucială a K^+ în iniţierea mobilităţii spermatozoidului la mamifere, sinergic cu ionii de Mg^{2+}. S-a constatat că nivelul ionic al plasmei seminale variază foarte puţin funcţie de temperatură, fiind deosebit de stabil la taurii de reproducţie. În tehnica I.A., datorită şocului rece, apar consecinţe funcţionale determinate de pierderea K^+ din celulă şi destabilizarea echilibrului distribuţiei ionice. Masurătorile electrochimice de Na^+, K^+, Cl^- şi de pH au arătat că transportul local prin membrana spermatozoizilor duce la modificarea volumului celular şi al potenţialului transmembranar. De aceea, compoziţia diluanţilor trebuie să ţină cont de modificările fizico-chimice şi biochimice pe care le produc spermatozoizilor (*Kann M., L., Hollonde E., 1972, Ultrastructural and cytochemical modifications of the cell coat of bull spermatozoon before and after freezing, Proceedings of the 7th International Congress on Animal Reproduction, München, vol.2, p. 1325*).

Distribuția ionilor între plasma seminală și spermatozoizi este diferită. Spermatozoizii se caracterizează prin concentrații mari de K^+ și Mg^{2+}, iar plasma seminală are concentrații mari de Na^+ și Ca^{2+}, consecință a funcționării "pompei de Na". În plasma seminală, o mare parte din calciu este complexat, deși concentrația proteinelor ce leagă calciul este egală în plasmă și în spermatozoizi. Șocul rece produce scăderea calciului ionizat din plasmă și creșterea simultană a conținutului de calciu complexat, afectând indirect mobilitatea gameților.

Congelarea are efecte severe și asupra **conținutului în ADN**. S-a constatat că acizii nucleici au tendința să se aglutineze pe măsură ce gameții sunt supuși unor temperaturi scăzute, la -196^0 C, în azot lichid (*Lodge J., R., Graves C., N., Salisbury G., W., Hart R., G., 1972, Aging phenomena in spermatozoa (VI). Chemical determinations of DNA of fresh and aged bull spermatozoa, The 7th International Congress on Animal Reproduction, München, vol. 1, p. 474*). În plasma seminală spermatozoidul este protejat de transferuri accidentale de ADN străin (bacterii, viruși, ADN de la alte specii de animale) de anumiți compuși care blochează receptorii responsabili de acest fenomen. Nu același lucru se petrece în diluanții spermei, în situația în care plasma seminală a fost îndepărtată. În consecință, apare pericolul denaturării moleculelor de ADN, prin contaminare cu ADN microbian, în special (*Canedi A., A., Bottino J., A., 1972, Stability of DNA-P content in bull spermatozoa during storage in vitro, The 7th International Congress on Animal Reproduction, München, vol. 2, p.1211*).

Congelarea spermatozoizilor induce inclusiv modificări legate de **echipamentul enzimatic** al gameților, datorate lezării membranelor plasmatice. Se constată astfel, scăderea dramatică a activității **dehidrogenazelor** la spermatozoizii diluați și congelați. În procesul congelării **fosfataza alcalină** nu se denaturează, însă la diluare ea se conjugă cu proteinele gălbenușului de ou, care-i modifică activitatea. O altă enzimă afectată de procesul de congelare, în sensul dublării activității ei, este **aldolaza** din sperma de vier (*Buruiană L., M., Khalil H., Seiciu Fl., Niculescu H., S., 1980, The influence of conservation by congelation upon the proteines, LDH and MDH on spermatozoa of bull, The 9th International Congress on Animal Reproduction, Madrid, vol. 3, p. 424*).

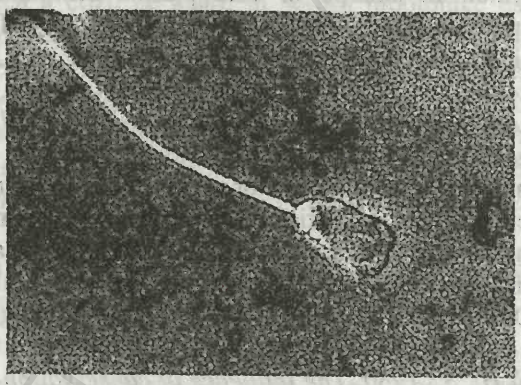
De asemenea, procedeele de diluare și congelare nu modifică activitatea fosfatazei acide și a pirofosfatazei acide, dar scad activitatea **pirofosfatazei alcaline**. Totodată, activitatea **transaminazelor GOT și GPT** (de origine intracelulară) crește mult în mediul extracelular, indicând gradul de lezare a membranelor spermatice ce au fost supuse influențelor toxice ale diluării.

Toxicitatea **gălbenușului de ou**, ca parte a unor diluanți utilizați pentru conservarea spermei de vier, a fost evidențiată electroforetic, prin apariția unor complexe anionice între lipoproteinele gălbenușului de ou și anumite proteine spermatice. Aceste complexe determină uneori coagularea parțială a spermei la contactul cu diluantul (*Jeyendran R., S., Hunter A., C., 1980, Properties of the bovine seminal plasma-egg yolk protein interaction complex formed during cryopreservation, The 9th International Congress on Animal Reproduction, Madrid, vol. 3, p. 382; Shannon P., Curson B., 1972, The effect of egg yolk levels*

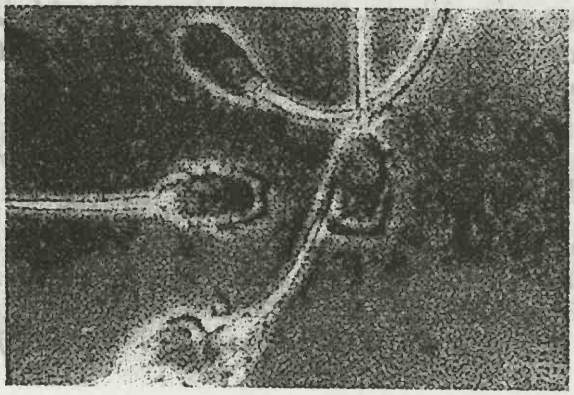
in bovine seminal plasma and dead sperm toxins, The 7th International Congress on Animal Reproduction, München, vol.1, p. 258).

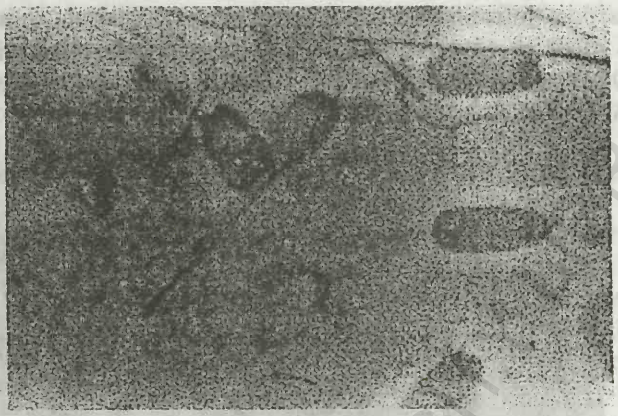
Utilizarea unor diluanți diferiți pentru materialul seminal de taur (fructoză, acid citric, tris, gălbenuș de ou), respectiv de vier (glucoză, citrat de sodiu, EDTA, bicarbonat de sodiu, clorură de sodiu), urmată de fotografierea în contrast de fază a unor eșantioane de spermă diluată, a scos în evidență leziuni ale spermatozoizilor la nivelul membranelor plasmatice, acrozomale și flagelului (*Tamba-Berehoiu Radiana, fotografii originale, 1998, Teză de doctorat, Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară, București; Tamba-Berehoiu R., Constantin N., 2000, Particularități metabolice ale spermatozoizilor la animalele de fermă, Ed. Monitor-Prod Serv*).

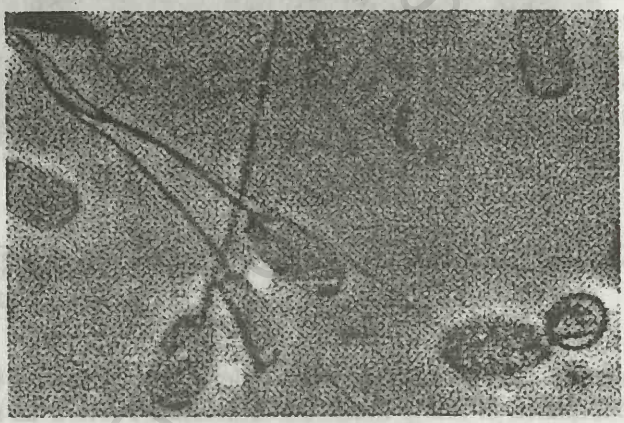
Următoarele fotografii, deosebit de spectaculoase, relevă plesnirea membranelor acrozomale, modificări ale formei capului, îngroșări ale pieselor intermediare, exprimarea unei luminiscențe puternice datorate deshidratării gameților și probabil vacuolizării lor. De asemenea, se observă tendința gameților la agregare, datorită abolirii mobilității.



În ilustrațiile de mai jos se văd cozi rupte și capete detașate de cozi. Dacă diluantul are presiunea osmotică diferită de cea din interiorul celulei sexuale, atunci apar fenomene de spargere a membranelor plasmatice, concomitent cu deversarea conținutului în mediu, așa cum se observă.

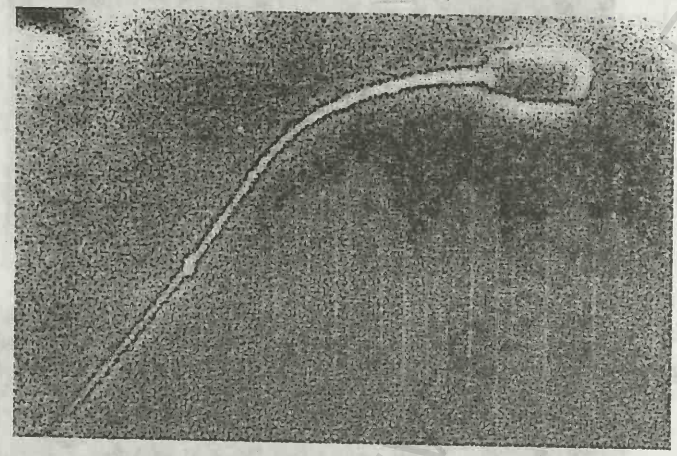






În fotografia următoare se evidenţiază lezarea membranelor acrozomale, a membranelor plasmatice şi hipertrofierea capetelor.

Un aspect interesant apare la un spermatozoid cu membranele celulare deteriorate, care prezintă luminozitate datorită deshidratării, având piesa intermediară şi flagelul puternic îngroşate, ca o consecinţă a afectării învelişului lipoproteic de la acest nivel.



15.3. TOXICOLOGIE BIOTEHNOLOGICĂ INDUSTRIALĂ

Domeniile industriale sunt extrem de diversificate, iar biotehnologia îşi găseşte aplicabilitatea în foarte multe dintre acestea. Factorii de risc toxic trebuie evaluaţi la omologarea oricărui produs industrial şi îndepărtaţi, pe cât posibil, pe parcursul procesului biotehnologic. Vom evidenţia câteva dintre ramurile biotehnologice cu aplicabilitate industrială, unde pot apărea potenţiali factori de risc toxicologic.

Microbiologia industrială se confruntă cu pericolul contaminării microorganismelor selecţionate, cu specii toxigene. Produşii obţinuţi prin **procese biotehnologice** (culturi celulare, acizi organici, amino-acizi, proteine, enzime etc) necesită purificări costisitoare după separarea din mediul de reacţie, iar materiile prime introduse (inclusiv substanţe chimice organice şi anorganice) trebuie să îndeplinească criteriile de puritate. Aceeaşi problemă se pune în **biotehnologiile farmaceutice**, la obţinerea şi purificarea antibioticelor, spre exemplu. Produsele biotehnologice supuse unor acţiuni **frigotehnice**, se pot degrada, putând apărea compuşi secundari toxici. **Biotehnologia alimentară**, **biotehnologia nutreţurilor**, **biotehnologia obţinerii produselor agricole**, **horticole**, se confruntă de asemenea, cu riscuri toxicologice legate de micotoxine, toxine bacteriene, substanţe toxice provenite din fermentaţii necontrolate, dintre care unele pot fi mutagene şi carcinogene.

Produsele obţinute ca urmare a aplicării **ingineriei genetice**, un domeniu de vârf al biotehnologiei de altfel, conţin uneori alergeni, precum o serie de

proteine sau enzime, ce prezintă toxicitate, fapt pentru care anumite soiuri de cereale sau legume obținute în acest mod, nu sunt agreate de piața Europeană. **Biotehnologia obținerii proteinelor și enzimelor** se confruntă poate, cu cele mai mari riscuri toxicologice, prin potențialul puternic alergogen al acestor compuși. Totodată, deosebit de importante **sunt biotehnologiile de obținere a materiilor prime de origine vegetală, horticolă, animală.** Materiile prime pot fi contaminate cu substanțe toxice, înainte de procesare, dar o serie de factori de risc toxicologic apar pe parcursul procesării. **Reciclarea biotehnologică a produselor reziduale,** necesită un control microbiologic și toxicologic deosebit de atent. De altfel, biotehnologia se implică în **ecologie** și preconizează **tehnici de bioremediere a mediului,** a căror scop este exact acela de a anihila reziduurile toxice. Referindu-ne la **radiobiologie,** nu trebuie uitat nici pericolul iradierii unor produse biotehnologice, care devin astfel extrem de toxice.

În consecință, pornind de la **procesele biotehnologice de industrializare,** mai ales a **produselor agroalimentare** și mergând până la **ambalarea** acestora, este necesar să se facă, alături de **controlul de calitate,** un **control toxicologic** al produsului. În vederea menținerii calității, inocuității și lipsei de toxicitate a produselor biotehnologice, trebuie să se aplice pe parcursul procesării acestora, prevederile standardelor de calitate în vigoare și să se respecte bunele practici de producție (GMP).

15.3.1. Toxinele microorganismelor industriale. Structură și metabolizare

Microorganismele industriale utilizate în biotehnologii, fungi și bacterii, biosintetizează anumiți metaboliți secundari, incluși în categoria toxinelor (micotoxine și toxine bacteriene), care exercită efecte negative severe asupra organismelor superioare, în special asupra mamiferelor și omului. Nu toate microorganismele sunt toxigene, motiv pentru care se pot utiliza în procesele fermentative implicate în maturarea mezelurilor, brânzeturilor etc.

Se observă că aceiași toxină poate fi sintetizată de o mare varietate de specii a unui gen de fungi, dar nu în mod necesar de toate tulpinile aceleiași specii. De asemenea, în anumite circumstanțe, aceleași specii de fungi pot produce forme diferite de micotoxine. Spre exemplu, fungul Penicillium verrucosum, principalul producător al ochratoxinei în Europa, necesită circumstanțe legate de un mediu extrem de umed, cu un nivel de CO_2 în aer, mai mic de 50 %, pentru a produce această toxină.

O altă problemă importantă este posibilitatea și acuratețea detecției contaminării, deoarece micotoxinele de pe cereale nu sunt răspândite uniform și există pericolul ca acestea să existe, chiar dacă în anumite probe prelevate ele să nu fi fost puse în evidență. Totodată, detecția micotoxinelor nu depinde de punerea în evidență a fungilor în probele respective și nici invers, deoarece micotoxinele stabile contaminează materialul biologic și după ce fungul producător a fost distrus. Controlul micotoxinelor, ajunse ulterior în alimente, nu poate fi făcut în consecință, la un singur nivel, fiind necesară analiza întregului lanț alimentar al unui produs.

Printre microorganismele importante în biotehnologia industrială se numără reprezentanții speciilor de fungi din genul Aspergillus. Aceștia sunt răspândiți abundent în sol, aer, alimente stocate, materii organice, corpuri vii etc. Interesul deosebit al biotehnologiei pentru genul de fungi amintit, este reprezentat de produsele metabolismului lor, anume: metaboliții primari (acizi organici, enzime etc), și secundari, printre care mulți sunt micotoxine.

Din punct de vedere istoric, date despre acest gen de fungi apar încă din 1729 și continuă cu noi descoperiri până în 1983, când se utilizează deja frecvent în biotehnologii (tabelul 15.7).

Tabelul 15.7

Scurt istoric privind evenimentele științifice importante în studiul genului Aspergillus

Anul	Descoperitorul	Evenimentul
1729	P. A. Micheli	Publicarea "Nova Plantarum genera"; numele de Aspergillus dat unui grup de fungi a căror spori aveau un aspect caracteristic
1827	J. Schilling	Prima observare continuă de dezvoltare a unui fung, de la spor până din nou la spor, făcută pe Aspergillus glaucus
1854	A. de Bary	Prima asociere dintre starea de fung perfect (Eurotium herbariorum) și fung imperfect (Aspergillus glaucus)
1867	P. Van Tiegham	Stabilirea importanței Aspergillus în biochimie, odată cu identificarea implicării lui Aspergillus niger în fermentarea acidului galic
1869	J. Raulin	Primul mediu de cultură definit pentru un microorganism, respectiv pentru Aspergillus niger
1894	J. Takamine	Primul patent pentru un preparat enzimatic comercial extras din fungi: takadiastaza din Aspergillus flavus-oryzae
1917	J. N. Currie	Demonstrează că producerea comercială a acidului citric din Aspergillus niger este fezabilă
1952	J. A. Roper	Descoperirea ciclului parasexual descoperit la Aspergillus nidulans
1961	Sargent și colab.	Identificarea fungului Aspergillus flavus, ca factor incriminant în boala X a curcanilor; începe **"revoluția micotoxinelor"**
1962	Sargent și colab	Se denumesc **"aflatoxine"** o serie de metaboliți toxici secundari, izolați din specii de Aspergillus
1983	Ballance și colab.	Descrierea metabolismului primar la Aspergillus nidulans și elucidarea metabolismului secundar pentru un fung

Odată cu detectarea micotoxinelor, apar date de micologie medicală la om și animale, care incriminează speciile de Aspergillus și care descriu diverse manifestări clinice: de la simple alergii, la infecții sistemice (aspergilozele). Printre

micotoxine, aflatoxinele prezintă poate cel mai ridicat risc toxicologic, fiind cele mai potente hepatocarcinogene, mutagene şi teratogene.

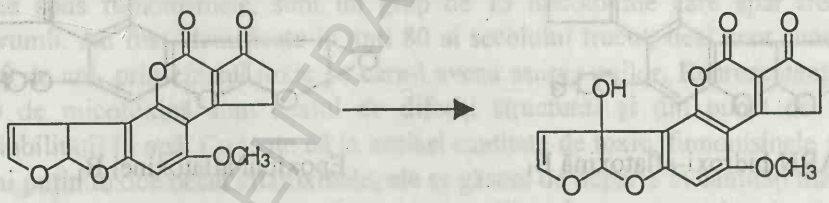
S-a constatat că riscul intoxicării apare chiar şi prin consumul unor alimente proaspete, care nu prezintă urme vizibile de fermentare microbiană, dar care pot conţine micotoxine (chiar atunci când agentul microbian nu poate fi detectat). Alături de aflatoxine, alţi toxigeni precum: acidul aspergilic, asperthecina etc, contribuie la mărirea factorului de risc. Structurile acestor micotoxine au fost prezentate în vol I al Tratatului de Biotehnologie (*Joanna D'arc,A., Herzog Soares, 2003, Opportunistic infections by Toxoplasma gondii caused by exposure to coumarins originated from toxigenic fungi, Rev. Bras. Farm., 84 (3), Brasil*).

Practic, singurele specii de Aspergillus netoxigene sunt Aspergillus niger şi Aspergillus oryzae, acesta din urmă fiind cel mai utilizat în biotehnologiile industriale, cele mai toxigene fiind Aspergillus flavus şi Aspergillus parasiticus.

Printre cele aproximativ 20 de substanţe incluse în categoria aflatoxinelor, în alimente se regăsesc cu precădere 4, anume: aflatoxinele B_1, B_2, G_1, şi G_2. În lapte şi produsele din lapte s-au identificat cu precădere aflatoxinele M_1 şi M_2, apărute prin biotransformarea în rumenul ierbivorelor a altor tipuri de aflatoxine (*Jean-Francois Quillien, 2002, Mycotoxins, INRA, France*). Incidenţa apariţiei aflatoxinelor este sporită în ţările în curs de dezvoltare din Africa şi Asia, care nu au implementate sistemele de control calitativ al alimentelor.

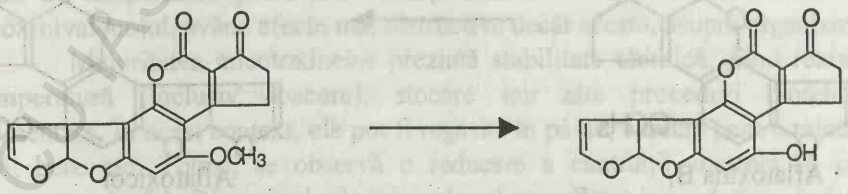
Metabolizarea aflatoxinelor (spre exemplu, aflatoxina B_1) poate lua diferite direcţii, funcţie de ţesutul şi de enzimele implicate în proces, după cum urmează:

-hidroxilarea, este o cale majoră de metabolizare, având loc în microzomii hepatici; Aflatoxina B_1 se transformă în aflatoxina M_1 fără a-şi reduce toxicitatea.



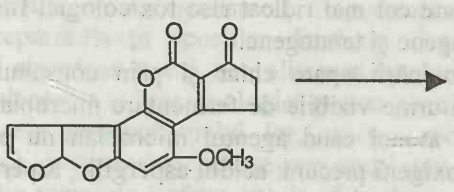
Aflatoxina B_1 Aflatoxina M_1

- demetilarea are loc tot în microzomii hepatici, iar aflatoxina B_1 se transformă în aflatoxina P_1, alt metabolit toxic.



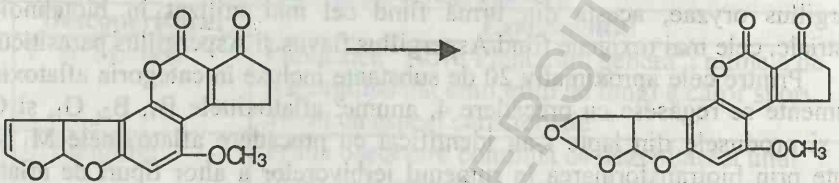
Aflatoxina B_1 Aflatoxina P_1

- adiţia apei la una dintre dublele legături, în microzomii hepatici, transformă aflatoxina B_1 în aflatoxina B_{2A}.

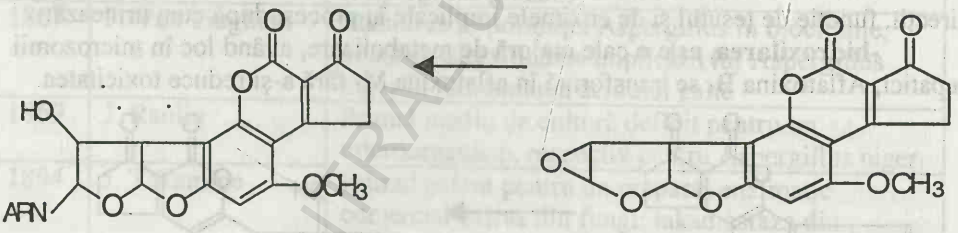


Aflatoxina B_1 Aflatoxina B_{2A}

- **oxidarea** (epoxidarea) are loc tot la nivelul microzomilor hepatici şi aflatoxina B_1 trece într-un epoxid.

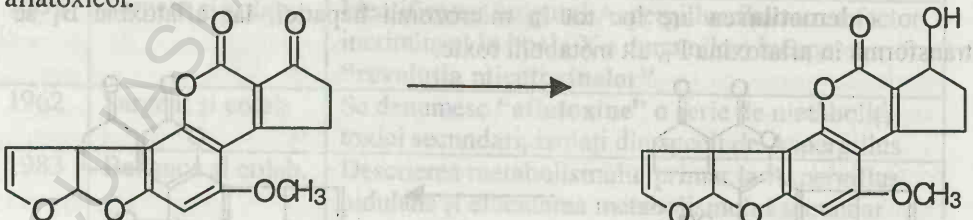


Epoxidarea poate avea urmări severe, deoarece epoxidul formează aducţi cu acizii nucleici, atât cu ADN, cât şi cu ARN (v. Cap. Noţiuni de toxicologie biotehnologică moleculară).



Aduct ARN-hidroxi-aflatoxină B_1 Epoxidul aflatoxinei B_1

- o **reducere** nemicrozomală (în fracţiunea solubilă) transformă aflatoxina B_1 în alt tip de aflatoxină, descoperită mai târziu, anume aflatoxina R_0 sau aflatoxicol.



Aflatoxina B_1 Aflatoxicol

Menţionăm că microzomii hepatici provin practic prin mojararea reticolului endoplasmatic, iar metabolizarea substanţelor liposolubile are loc numai la acest nivel, datorită echipamentului enzimatic adecvat. Enzimele microzomale

au tendința de a ataca în special substanțele toxice liposolubile exogene, dar nu în exclusivitate. S-a lansat ipoteza că aceste enzime atacă de fapt orice substrat potrivit, exogen sau endogen, numai dacă acesta este, sau devine liposolubil. O serie de alte enzime (reductazele) acționează și în fracțiunile hidrosolubile nemicrozomale. În general, oxidările (hidroxilările) microzomale hepatice, beneficiază de aportul enzimatic al citocromului P_{450} (sistem enzimatic hemoproteic, ce se găsește în proporție de 20 % față de restul proteinelor din ficat) și al nucleotidului NADPH. Citocromul P_{450} se găsește de asemenea, în microzomii renali, suprarenali și mucoasa intestinală.

În prezent, proiectele Europene se concentrează asupra altor micotoxine, mai puțin mediatizate, dar extrem de frecvente în furaje și alimente, precum: **ochratoxina A, fumonisina, zearalenona** (ZEA) și **deoxinivalenolul** (DON).

Alături de aflatoxine, **ochratoxina** reprezintă un risc toxic deosebit, mai ales în regiunile temperate (vestul Europei, Canada, America de Sud), unde este produsă de Penicillium verrucosum și în regiunile tropicale, unde este produsă de Aspergillus ochraceus. Ea contaminează în mod natural o mare varietate de plante de cultură (cereale, cafea, alte leguminoase, fructe, mai ales uscate). A fost detectată în băuturi precum: cafea, vin, bere, și sucuri de citrice. Se acumulează în țesuturile și organele mamiferelor, fiind depistată în rinichi, ficat și sânge, prin transfer din hrana contaminată.

Fumonisina, zearalenona (ZEA) și deoxinivalenolul (DON) sunt produse de specii de Fusarium, găsindu-se mai ales pe cereale. Astfel, **fumonisina,** sau mai bine spus fumonisinele, sunt un grup de 15 micotoxine care apar frecvent pe porumb. Au fost identificate în anii 80 ai secolului trecut, deși erau cunoscute de 150 de ani, prin efectul toxic pe care-l aveau asupra cailor. Reprezentanții acestui tip de micotoxină sunt destul de diferiți structural și din punct de vedere a solubilității în apă. Cu toate că la aceiași cantitate de toxic, fumonisinele sunt mult mai puțin toxice decât aflatoxinele, ele se găsesc de departe în cantități mai mari pe cereale, manifestându-și din plin toxicitatea. **Zearalenona** este sintetizată de specii de Fusarium la o climă rece și umedă, în perioada de creștere a plantelor. **Deoxinivalenolul** este unul dintre cei 150 de componenți ai grupului trichotecenelor. Se formează în plante înainte de recoltare, iar prezența sa depinde mult de temperatură și de alte condiții climatice. **Toxina T-2** este înrudită cu deoxinivalenolul, având efecte mai distructive decât acesta, asupra organismelor.

Majoritatea micotoxinelor prezintă stabilitate chimică, fiind rezistente la temperatură (inclusiv coacere), stocare sau alte proceduri biotehnologice alimentare. În acest context, ele pot fi regăsite în pâine, cereale pentru micul dejun, vin, bere etc. Totuși, se observă o reducere a cantității acestora în cerealele procesate. Astfel, făina pierde deoxinivalenol sau aflatoxine, odată cu îndepărtarea tărâțelor. Pericolul apariției și creșterii cantității de micotoxine apare totuși la stocarea alimentelor. În tabelul 15.8 sunt evidențiate produsele alimentare în care au fost depistate diferite micotoxine.

Tabelul 15.8

Contaminarea produselor alimentare cu micotoxine

Produse Contaminate	Principalele micotoxine			
	Ochratoxină	Fumonisine	Zearalenonă	Deoxinivalenol
Cereale				
Ovăz				*
Grâu			*	*
Orz			*	*
Porumb	*	**	*	*
Orez		*	*	*
Secară				*
Sorg		*		*
Fasole		*		
Produse derivate	*	*	*	*
Alte produse agricole				
Cacao	*			
Cafea	*			
Bere	*	*	*	*
Vin	*			
Fructe uscate	*			
Fructe deshidratate	*		*	
Produse animale				
Carne			*	
Lapte			*	
Ouă			*	

Efectele toxice ale micotoxinelor depind în mare parte de structura chimică a acestora, dar și de cantitatea ajunsă în organism. În Europa, cea mai mare parte din cantitatea de ochratoxină, spre exemplu, este preluată prin ingestia cerealelor.

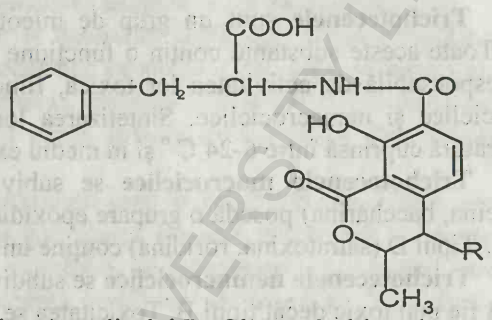
Ochratoxina A este o substanță nefrotoxică, cu acțiune carcinogenă (experimente pe șoareci) și teratogenă, fiind de asemenea, imunotoxică și neurotoxică. Se suspectează a fi implicată în nefropatia endemică Balcanică și în apariția tumorilor tractului urinar la om. Date statistice recente demonstrează că nefrita cronică interstițială din Franța și Africa de Nord au legătură cu expunerea prelungită la doze ridicate de ochratoxină A.

Este suspectat efectul genotoxic al ochratoxinei, datorită intervenției acesteia în biosinteza proteică. Urmele acceptabile de ochratoxină în hrana zilnică, ar trebui să fie de la zero, la nivelul câtorva nanograme/kg, pentru a nu produce efectele amintite. Practic, neexpunerea totală la ochratoxină este imposibilă, având în vedere că aceasta se găsește constant în cerealele și produsele cerealiere, care constituie și sursa majoră de contaminare a animalelor sau omului.

Efectul carcinogen al ochratoxinei se manifestă prin inducerea unor tumori la nivelul rinichiului, ficatului și a tractului urinar. În privința genotoxicității, s-a constatat că ochratoxina rupe lanțurile nucleotidice ale ADN, în vitro, iar in vivo dezorganizează sinteza ADN, provocând mutații genetice în celulele bacteriene.

Totodată, ochratoxina formează aducţi cu ADN din rinichi, splină, ficat, precum şi cu ADN din celulele bronhiilor. Se presupune stabilirea unor legături covalente puternice între toxic şi moleculele de ADN.

Biotransformarea ochratoxinei nu este pe deplin elucidată, dar s-a constatat că ea se bioactivează în organisme, transformându-se în metaboliţi ADN-reactivi. Toxicitatea se datorează în special structurii de tip izocumarinic. Remanenţa ochratoxinei în organisme (timpul de înjumătăţire) este relativ mare, comparativ cu cea a metaboliţilor ei.



Ochratoxina
(formula generală)

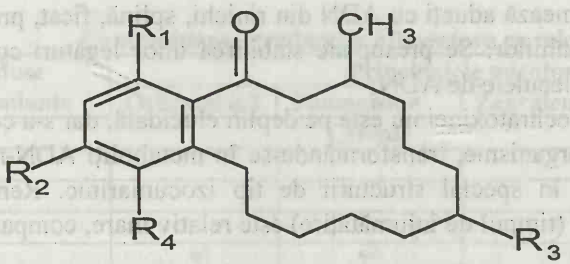
Menţionăm că la ochratoxina A, radicalul R=Cl, pe când la ochratoxina B, R=H.

Deoarece toxicitatea ochratoxinei este foarte mare, s-a stabilit totuşi, ca limita superioară admisibilă zilnic să fie de 5 ng/kg. (*Opinion of Scientific Commitee on Food Ochratoxin A, sept. 1998*).

Fumonisinele perturbă sinteza lipidelor în celulele nervoase, provocând leziuni la nivelul sistemului nervos, leziuni hepatice şi pulmonare. Consumatorii constanţi ai unor mari cantităţi de porumb sunt expuşi frecvent cancerului esofagian. Fumonisinele produc leziuni inclusiv plantelor, atacând membranele celulare şi micşorând sinteza clorofiliană.

Zearalenona este o micotoxină lactonică produsă de Fusarium sp., care se comportă ca un fitoestrogen. Toxicitatea ei rezidă în faptul că se leagă de receptorii estrogenici celulari şi intervine astfel, în reglarea endocrină a funcţiei de reproducere la femele şi a spermatogenezei la mascul (pubertatea precoce la copiii din Puerto Rico). S-a observat că toxina stimulează o proliferare celulară anormală a ovarului la suine, inhibă capacitatea imunologică a organismului şi blochează o serie de enzime implicate în sinteza estrogenilor. Este prezentă pe toate gramineele şi leguminoasele, într-un mediu umed şi cald.

Totodată, zearalenona induce un stres oxidativ celular, inhibă sinteza proteică şi replicarea ADN, manifestându-şi efectul cito- şi genotoxic. În principal, se produce hipertrofia organelor genitale femele şi apare sterilitatea. Anumite experimente au sugerat că zearalenona induce necroză tisulară şi modificări celulare tipice care conduc la apoptoză. (*Wasowicz, K., Gajeska., M., 2005, Influence of chronic administration of zearalenone on the processes of apoptosis in the porcine ovary, Vet. Med., Czech, 50, 12*).

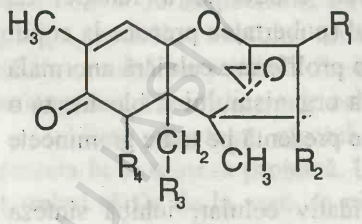


Zearalenona

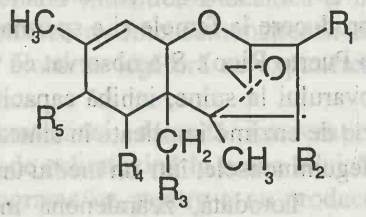
Trichotecenele sunt un grup de micotoxine având aceiaşi structură de bază. Toate aceste substanțe conțin o funcțiune epoxidică plasată la C_{12}-C_{13}, care este responsabilă de activitatea lor toxică, fiind clasificate în două mari grupe: macrociclice şi nemacrociclice. Sintetizarea lor are loc cu mare eficiență la o temperatură cuprinsă între 6-24 C ° şi în mediu extrem de umed.

Trichotecenele macrociclice se subivid în tipurile C şi D. Tipul C (crotocina, baccharina) posedă o grupare epoxidică adițională în pozițiile C_7-C_8 sau C_9-C_{10}. Tipul D (satratoxina, roridina) conține un inel macrociclic între C_4-C_{15}.

Trichotecenele nemacrociclice se subdivid în tipurile A şi B, unde tipul A pare să fie mai toxic decât tipul B. Toxicitatea se datorează diferiților radicali de pe catenele hidro- şi lipofile. Tipul A include: **toxina T-2, toxina HT-2, diacetoxiscirpenolul** (DAS) etc. În tipul B se înscriu: **deoxinivalenolul (DON), 3-acetildeoxinivalenol, 15-acetildeoxinivalenol, nivalenolul (NIV), fusarenona-X (FUX** identic cu **4-acetilnivalenol)** etc (*Toth, B., and colab. 2006, Mycotoxin production and lineage ditribution in Central Europeen isolates of the afusarium graminearum clade, Taxonomy, Population Genetics, and Genomics of Fusarium spp.Hungary).* Mari producătoare de trichotecene de tip A, în special, sunt fungii: Fusarium sporotrichioides, F. sambucinum, F. acuminatum, F. poae şi F. compactum, pe când tipul B este sintetizat mai ales de F. culmorum şi F. graminearum. Ultimii doi fungi produc de asemenea, cantități apreciabile de zearalenonă. Totodată, în Europa Centrală şi de Nord, apare des o micotoxină, anume **moniliforma**, produsă de F. avenaceum.



Tip A



Tip B

Tip A: unde T-2 (R_1= OAc), HT-2 (R_1= OH)

Tip B: unde DON (R_1= OH, R_2= H, R_3= OH, R_4= OH), NIV (R_1= OH, R_2= OH, R_3= OH, R_4= OH), 3 AcDON (R_1= OAc, R_2= H, R_3= OH, R_4= OH), 15 AcDON (R_1= OH, R_2= H, R_3= OAc, R_4= OH), FUS-X (R_1= OH, R_2= OAc, R_3= OH, R_4= OH).

Cu toate că toxicitatea trichotecenelor este apreciabilă, recunoscută, cercetată, iar cantităţile de astfel de micotoxine sintetizate este mare, găsindu-se inclusiv în produsele finite, procesate industrial, nu s-a stabilit un statut al lor, la fel cum s-a stabilit pentru aflatoxine, spre exemplu. Limitele de toleranţă nu sunt bine delimitate în vederea unui control al calităţii materiilor prime agricole sau ale produselor procesate industriale. Există totuşi ţări (Canada, Rusia, USA), unde se consideră că limită admisă la deoxinivalenol, pentru consumul uman se înscrie între 500-2000 μg/kg, iar pentru consumul animalelor, până la 4000 μg/kg.

Toxicitatea trichotecenelor se datorează capacităţii lor de a inhiba sinteza proteică. Imunotoxicitatea trichotecenelor de tip A (T-2, spre exemplu) este mai mică decât cea a tipului B. În general, toxinele T-2 şi HT-2 provoacă cele mai puternice efecte ale unei toxicităţi acute, urmate de nivalenol. Deoxinivalenolul este de 10 ori mai puţin toxic.

Toxina T-2 provoacă o intoxicaţie care se manifestă prin greaţă, ameţeală, vomă, leziuni necrotice în gură şi gât, diaree hemoragică severă şi hemoragii la nivelul diferitelor organe. Este de asemenea, un imunosupresor, atacând ireversibil măduva osoasă şi provocând reducerea numărului de leucocite. Are efect asupra proteinelor serice, provoacă depletiţie limfocitară şi ulterior necroză stomacală. Micotoxina nu se acumulează în organism, ci are tendinţa de a se elimina, timpul de înjumătăţire fiind de 30 de minute maxim.

Căile majore de metabolizare a trichotecenelor includ: oxidarea, deepoxidarea, hidroliza şi glucuronoconjugarea. Carboxilazele din sângele uman sunt implicate în hidroliza toxinei T-2, la metaboliţi mai polari şi mai puţin toxici.

Un alt efect nociv al T-2 este descreşterea cantităţii antioxidanţilor celulari: tocoferoli, acid ascorbic, retinol, retinil-esteri. Totodată, creşte susceptibilitatea ficatului la peroxidarea lipidelor. T-2 acţionează sever asupra animalelor gestante, provocând toxicitate maternă, malformaţii fetale sau moartea fătului, având posibilitatea să traverseze placenta.

Ca mecanism de acţiune, s-a evidenţiat că toxina T-2 afectează sinteza proteică, având ca urmare un efect imunosupresor. Trichotecenele în general, se leagă la subunităţile ribozomale 60 S şi interacţionează cu peptidiltransferaza implicată în elongarea catenei proteice şi în paşii finali ai biosintezei proteinelor. Gruparea epoxidică $C_{12} - C_{13}$, comună tuturor trichotecenelor, este implicată în inhibiţia sintezei proteice, pe când anumiţi radicali legaţi de C_3 şi C_4 ai ciclului, determină alte efecte secundare toxice. Inhibarea iniţială a sintezei proteice acţionează la rândul ei asupra sintezei RNA, care este sever diminuată. În consecinţă, toxina T-2 (şi alte trichotecene) are un efect citotoxic asupra diviziunii celulare, în special asupra celulelor care se divid rapid, având o rată accelerată de regenerare, precum: celulele limfocitare, eritrocitele, celulele criptate intestinale, parenchimul ficatului, rinichilor, pancreasului. Cu alte cuvinte, ţinta primară a toxinei T-2 sunt leucocitele şi sistemul imunitar.

O comparaţie la nivel molecular, a mecanismului de acţiune şi a toxicităţii, între aflatoxine, ochratoxine şi trichotecene, indică faptul că deşi primele

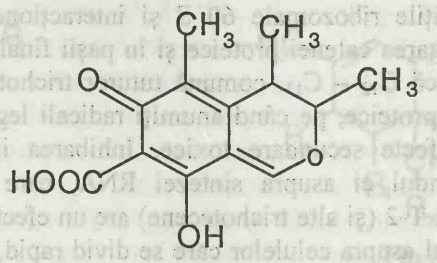
evenimente toxidinamice diferă, în final, efectul imunosupresor comun acestor toxice, este provocat de un mecanism similar al inhibării sintezei proteice.

Deoxinivalenolul produce slăbirea generală a organismelor, necroze (gangrene) în diferite țesuturi (peretele gastro-intestinal, măduva osoasă, țesutul limfatic), modifică parametrii sângelui și atacă sistemul imunitar. De altfel, Comitetul Științific pe probleme de alimentație a Comisiei Europene, sugerează că toxicitatea deoxinivalenolului se datorează efectului general asupra organismelor, și în special efectului lezionant asupra sistemului imunitar. O altă problemă rezidă în efectul sinergic al deoxinivalenolului cu alte trichotecene, de care practic, nu poate fi separat, deoarece sunt sintetizate concomitent.

Biosinteza trichotecenelor de către Fusarium sporotrichioides și Fusarium graminearum implică o cale biochimică complexă, cu multe etape, care începe cu ciclizarea farnesil-pirofosfatului la sesquiterpen-hidrotricodiena și continuă cu multiple oxigenări, ciclizări și esterificări. S-a constatat că față de speciile de Fusarium neproducătoare de micotoxine, cele de mai sus sintetizează o monooxigenază multifuncțională, a cărei genă a fost identificată (*Alexander, N., J., McCormick, 2006, Functional analysis of trichothecene biosyntetic genes via heterologous expression in a trichothecene-nonproducing Fusarium species, Taxonomy, Population Genetics, and Genomics of Fusarium spp., Canada*).

Un fenomen ecologico-biochimic deosebit de interesant este exemplificat de strânsa cooperare dintre anumite microorganisme endofite și diverse soiuri de plante, ce țin rol de gazde. Astfel, o asemenea cooperare între Fusarium și planta Baccharis megapotanea, face ca fungul să producă derivați ai acidului giberelic, iar planta să producă trichotecene macrociclice.

Citrinina este o toxină fungică produsă de Penicillium citrinum. Produce nefropatii, necroză hapatică, degenerescență testiculară, are efect mutagenic, teratogenic și carcinogen. Intoxicația se poate produce prin ingerarea alimentelor fermentate cu specii de Penicillium (*Maria Cristina Lura, Marta Beatriz Fuentes, 2001, Actividad de metabolitos de Penicillium citrinum sobre ratones Mus musculus, Rev Iberoam Micol, 18*).



Citrinina

Phomopsinele sunt o familie de micotoxine produse de Phomopsis leptostromiformis. Lupinaceaele (Lupinus albus, Lupinus luteus) sunt plantele cele mai contaminate de acest fung (20 % din plante). Semințele de lupinaceae sunt utilizate în hrana animalelor și sunt introduse sub formă de făină, în diferite produse destinate consumului uman, mai ales în Australia. Prin măcinare, mare

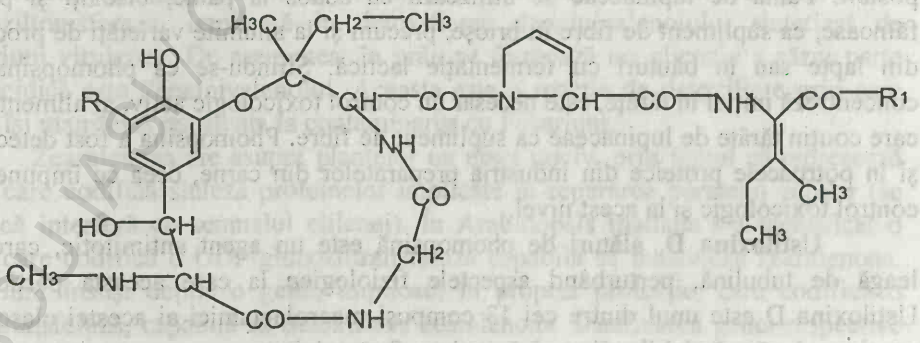
parte din micotoxinele respective sunt îndepărtate. Phomopsinele sunt stabile pe parcursul proceselor alimentare, inclusiv coacerea. Ele sunt absorbite din tractul gastrointestinal şi se metabolizează în ficat printr-un proces de bioactivare, compuşii fiind apoi eliminaţi prin rinichi.

Toxicitatea phomopsinelor se datorează abilităţii lor de a lega tubulina, fiind afectate astfel transportul intracelular al lipidelor, elongarea celulei în timpul mitozei, distorsionarea formei necleului şi ruperea membranelor nucleare şi citoplasmatice. Toxicitatea extremă se manifestă asupra ficatului, moartea animalelor şi a omului producându-se în urma colapsării acestui organ esenţial. Phomopsinele au un efect cumulativ în organisme şi s-a constatat că ele determină apariţia unor aberaţii cromozomiale. Totodată, produc toxicitate maternă, au o embriotoxicitate pronunţată şi sunt carcinogene. Tratamentul cu phomopsine a produs carcinoame hepatice, şobolanilor expuşi la toxic, prin injectare subcutanată.

Din punct de vedere chimic, phomopsinele sunt hexapeptide macrociclice. S-au identificat: phomopsina A, phomopsina B, phomopsinamina A şi octahidro-phomopsina A. Aceste toxine conţin nişte resturi neobişnuite de aminoacizi, precum: 3,4-didehidroprolină, 2,3-didehidroizoleucină, 2,3-didehidro acid aspartic, 3,4-didehidrovalină, 3-hidroxi-izoleucină şi N-metil-3-(3'-cloro-4',5'-dihidroxifenil)-serină. Phomopsina este solubilă în apă (pH=7,5) şi în alcool (pH=10). De curând a fost identificată şi phomopsina C, a cărei structură nu este pe deplin elucidată (*Australia, New Zeeland food authority, A toxicological review and risk assessment, Phomopsin in food, 2001, Technical report series no.1*).

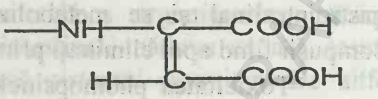
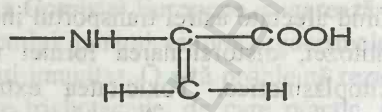
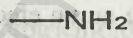
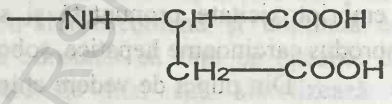
În afară de cereale, phomopsina poate fi regăsite pe produsele horticole (castane, mango). În rumenul ierbivorelor nu suferă transformări deosebite, aşa cum se întâmplă cu aflatoxinele, spre exemplu, ci ea este transportată rapid prin vena portă direct la ficat.

Se observă mai jos structura de bază a phomopsinelor:



Phomopsina

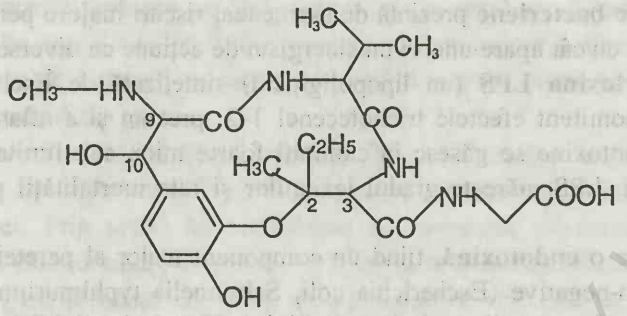
unde radicalii R şi R_1 au următoarele formule:

	R	R_1
Phomopsina A	Cl	
Phomopsina B	H	
Phomopsinamina A	Cl	
Octahidrophomopsina A	Cl	

Mecanismul toxicității acute a phomopsinei se datorează, cum s-a amintit, indisponibilizării tubulinei. În acest fel, toxina impiedică tubulina să polimerizeze la concentrații mai mici de 1 μM. De aici derivă impiedicarea formării fusului de diviziune pe parcursul mitozei şi lipsa transportului intracelular al lipidelor. De asemenea, se modifică activitatea unor enzime asociate membranei celulare şi scade nefiresc viscozitatea citoplasmei. Enzimele hepatice, care se comportă diferit din punct de vedere a activității, sunt: fosfataza alcalină, 5'-nucleotidaza, β-glucuronidaza, fosfataza acidă (a căror activitate creşte), succinatdehidrogenaza, glutamatoxalacetat transaminaza, lactatdehidrogenaza şi glucoz-6-fosfataza (a căror activitate scade).

Până în prezent nu s-a stabilit o doză letală valabilă pentru om, dar se consideră că phomopsinele trebuie menținute în alimente la cel mai jos nivel posibil. Făina de lupinaceae se utilizează ca adaos la pâine, biscuiți şi paste făinoase, ca supliment de fibre în brioşe, precum şi la anumite varietăți de produse din lapte sau în băuturi cu fermentație lactică. Ştiindu-se că phomopsina se concentrează inițial în tărâțe, este necesar un control toxicologic activ, al alimentelor care conțin tărâțe de lupinaceae ca supliment de fibre. Phomopsina a fost detectată şi în potroacele proteice din industria preparatelor din carne, ceea ce impune un control toxicologic şi la acest nivel.

Ustiloxina D, alături de phomopsină este un agent antimitotic, care se leagă de tubulină, perturbând aspectele fiziologice la care aceasta participă. Ustiloxina D este unul dintre cei 13 compuşi macrolactamici ai acestei clase, ce conține o legătură alchil-aril eterică, ce-i conferă unicitate.



Ustiloxina D

Biositeza ustiloxinei D porneşte de la D-serină şi cuprinde 31 de etape. Fiind înrudită cu phomopsina din punct de vedere structural, ustiloxina are în general, aceleaşi efecte toxice (*Hiroko Tanaca and all, 2003, Enantioselective Total Sinthesys of Ustiloxin D, J. Am. Chem. Soc., vol. 125, No. 23*).

În lupta împotriva micotoxinelor se dezvoltă cercetări în următoarele direcţii:

- **selecţia genetică** a plantelor rezistente la contaminarea cu fungi toxigeni;
- producerea de **plante transgenice** capabile să inhibe producţia fungică a micotoxinelor;
- producerea unor seminţe ce conţin **bacterii endofite**, care ar purea exclude dezvoltarea fungilor toxigeni;
- **preinfectarea** plantelor de cultură **cu specii de fungi netoxigeni**, care ar putea constitui factori de competiţie pentru speciile toxigene.

Ultimele două modalităţi de abordare a problemei fiind practic, modalităţi de **luptă biologică**. Demersurile biologice şi biotehnologice pentru îndepărtarea factorilor de risc legaţi de micotoxine sunt extrem de importante, în viziunea executării agriculturii organice (ecologice), adică fără a utiliza pesticide de sinteză (care sunt extrem de toxice la rândul lor).

Un prim exemplu de succes în acest domeniu este reprezentat de identificarea unei gene din planta Arabidopsis thaliana, care codifică enzima UDP-glucoziltransferază, implicată în detoxifierea deoxinivalenolului sintetizat de Fusarium virulence. De asemenea, în grâu se formează un glicozid a cărui parte neglucidică este deoxinivalenolul. Aceasta este o reacţie de detoxifiere prin care grâul îşi manifestă rezistenţa la contaminarea cu Fusarium.

Zearalenona are asupra plantelor un efect nociv, prin faptul că represează gena care codifică sinteza proteinelor implicate în repararea peretelui celular (se pare că interferă cu semnalul etilenei). În Arabidopsis thaliana s-a identificat o genă care codifică o UDP-glucoziltransferază capabilă să inactiveze zearalenona. Fusarium însuşi deţine o genă, implicată în propria protecţie, care codifică o sulfotransferază, capabilă să detoxifieze zearalenona. Inactivarea genei respective conduce şi la pierderea capacităţii de a produce zearalenonă sau zearalenon-sulfat. (*Adam, G.and colab., Fusarium genomics activities in the Austrian genome program GEN-AU, 2006, Taxonomy, Population Genetics, and Genomics of Fusarium spp., Viena).*

Toxinele bacteriene prezintă de asemenea, riscuri majore pentru sănătate, cu atât mai mult cu cât apare uneori un sinergism de acțiune cu diverse micotoxine. Spre exemplu, **toxina LPS** (un lipopoliglucid) sintetizată de Escherichia coli, potențează concomitent efectele trichotecenei T-2, precum și a aflatoxinei, chiar dacă aceste micotoxine se găsesc în cantități foarte mici, sub limita considerată toxică. Totodată, LPS mărește gradul leziunilor și rata mortalității provocate de toxina T-2.

LPS este o **endotoxină**, fiind un component major al peretelui celular al bacteriilor Gram-negative (Escherichia coli, Salmonella typhimurium). Molecula LPS toxinei este formată din trei părți: lipidul A (fracția insolubilă), miezul R și O-poliglucidul, care conține catene glucidice lineare și ramificate (Elin, Wolf, 1976). Practic, O-poliglucidul este responsabil de specificitatea antigenică a bacteriei. Reacția organismelor la LPS poate avea loc în prezența sau în absența bacteriei (în situația în care aceasta a fost distrusă cu antibiotice). Endotoxina poate fi preluată pur și simplu pe cale respiratorie dintr-un mediu bogat în praf contaminat.

Efectele predominante ale LPS se revarsă asupra ficatului, unde provoacă leziuni ale hepatocitului. Efectele devin dramatice prin asocierea cu micotoxinele amintite (T-2 și aflatoxina). De altminteri, Siller și Ostler (1961) constată că în majoritatea cazurilor de aflatoxicoză la curcani s-a izolat de asemenea, Salmonella din organele interne. În cazul intoxicației cu trichotecene, datorită inhibiției sintezei proteice pe care o provoacă, măresc susceptibilitatea organismelor la infecții bacteriene și expunerea la toxinele acestora.

Cele mai toxice substanțe cunoscute până în prezent sunt **neurotoxinele** produse de specii de Clostridium (Clostridium tetani, Clostridium botulinum), precum **toxina tetanică** și **toxina botulinică**, ce pot fi ușor preluate din sol sau alimente. Protejarea de toxina tetanică se poate face prin vaccinare, ceea ce nu este valabil în cazul toxinei botulinice, existând riscul ca ea să fie folosită ca armă biologică (agentul X). Purificarea și obținerea toxinei botulinice cristaline a evidențiat un neurotoxic extrem de sever. S-a constatat că formolul inactivează toxina, transformând-o într-un toxoid inactiv, care însă își păstrează antigenitatea. Efectele clinice ale toxinei tetanice constau în apariția paraliziei rigide, pe când victimele toxinei botulinice prezintă o paralizie periferică, mai puțin rigidă.

Toxicitatea alimentelor contaminate cu toxina botulinică se datorează în special faptului că se aplică pe scară mondială diferite procedee de păstrare. Clostridium botulinum crește, se multiplică și produce neurotoxină în mediu anaerob, specific modalităților de conservare a unor produse alimentare. În aceste condiții au fost izolate șapte serotipuri distincte de toxină botulinică, notate de la A la G. Nu toate aceste serotipuri produc intoxicații la om, ci numai serotipurile A, B, E și F. Serotipurile C, D și G își manifestă toxicitatea mai ales la animale (păsări, mamifere). Nu se cunoaște deocamdată explicația acestui aspect.

Cercetări recente au demonstrat că în afară de Clostridium botulinum există şi alte specii de Clostridium care poartă şi exprimă gena neurotoxinei. Nu acelaşi lucru se întâmplă cu gena ce codifică toxina tetanică, care nu se găseşte decât la Clostridium tetani.

Neurotoxina botulinică prezintă DL_{50}=1–3 ng/kg, în funcţie de calea de pătrundere în organisme. Toxina acţionează presinaptic şi împiedică eliberarea acetilcolinei. Prin studii electroforetice s-a constatat că neurotoxina botulinică cristalizată este un conglomerat de proteine, dar responsabilă de activitatea toxică este o singură proteină, cu masa de aproximativ 150 000 D. Deoarece această proteină este extrem de eficientă, în cantităţi mici, în blocarea neurotransmiţătorului, s-a demonstrat că ea acţionează ca o enzimă. De altminteri, cercetări pe Crynebacterium diphtheriae, care emite **toxina difterică**, au demonstrat că potenţa extremă a acestei toxine proteice se datorează calităţii de enzimă, având o acţiune puternică asupra mult mai multor molecule de substrat, decât ar fi necesare într-o corespondenţă stoichiometrică.

Toxina botulinică este formată din mai multe subunităţi, iar mecanismul activităţii ei implică trei etape: legarea de receptor, inserarea neuronală şi activitatea enzimatică propriu-zisă. Dacă se îndepărtează partea de enzimă (lanţ uşor ce conţine situsuri catalitice) din această toxină, ea se inactivează, iar restul rămas poate fi utilizat ca vaccin. În prima fază de acţiune a toxinei, aceasta se leagă specific cu capătul carboxil terminal al lanţului greu, de un receptor de pe suprafaţa neuronului. În a doua fază, un lanţ uşor al toxinei pătrunde în citoplasmă. Nu se ştie dacă şi lanţul greu proteic pătrunde în citoplasmă ulterior. În final, lanţul uşor acţionează ca o enzimă care catalizează reacţii nocive, prin care se perturbă eliberarea neurotransmiţătorului.

Cercetări recente conduc la ideea că receptorii neuronali ar putea fi gangliozide. De altfel, s-a constatat că toxicitatea neurotoxinei poate fi prevenită prin administrarea de sfingolipide. Totodată, s-a observat că diversele serotipuri ale toxinei nu împărtăşesc acelaşi receptor neuronal. Structura receptorilor neuronali nu este încă elucidată, cu toate că în 1994 un raport de cercetare a incriminat o proteină numită **sinaptotagmină**, faţă de care există afinitate a toxinei botulinice serotip B. După pătrunderea lanţului enzimatic în citoplasma neuronului, prin procesul de endocitoză receptor –mediată (RME), are loc o scădere bruscă de pH, până la 4,5. Activitatea enzimatică propriu-zisă depinde de o secvenţă de amino-acizi specifică unor proteaze Zn-dependente. În consecinţă, neurotoxinele Clostridiale prezintă activităţi proteolitice extrem de specifice pentru substratul lor, acesta fiind un ansamblu hetero-oligomeric asociat veziculei sinaptice.

Formele clinice de intoxicaţie cu toxină botulinică evoluează cu halucinaţii, disfagie, disartrie, slăbire şi paralizie musculară, urmată în general de sfârşit letal. Moartea survine prin paralizia muşchilor scheletici şi imposibilitatea

de a respira (*Middlebrook, J., Franz, D., 1995, Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare-Botulinum toxins,33, Acad. Press, New York*).

Toxinele bacteriene (cunoscute şi sub denumirile de moduline sau efectori) sunt ubiquitare, în concluzie implică domeniile biotehnologice. Ele relevă activităţi biochimice precise, care interferă cu procesele celulare. Multe dintre acestea (v. toxina botulinică, difterică, antrax) prezintă adaptări care includ proteine accesorii (subunităţi B), cu rolul de a se ataşa de receptorii celulari, precum şi componente enzimatice (subunităţi A), ce pătrund în celule şi prezintă de fapt toxicitate.

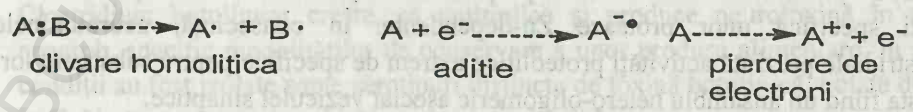
Toxinele proteice îşi exercită activitatea ca proteaze, fosfataze, ADP-ribozilaze, adenilat-ciclaze, GTP-aze şi nucleaze. Literatura citează efectul toxinelor botulinică şi tetanică asupra sistemului imunitar, prin atacul asupra celulelor T. S-a constatat că toxina produsă de Bacillus anthracis conţine două subunităţi enzimatice de tip A, dintre care una este cunoscută drept "factor edemic" (EF), iar cealaltă este numită "factor letal" (LF). Factorul EF este o adenilat-ciclază Ca-dependentă, pe când factorul LF este o protează Zn-dependentă. De remarcat că in vitro, bacteriile produc toxine în cantităţi mult mai mari decât in vivo, atunci când se produce de fapt o infecţie bacteriană. Fenomenul prezintă un oarecare avantaj pentru organismele afectate de infecţii bacteriene, având în vedere titrul relativ redus de toxine emise.

15.3.2. Aspecte toxicologice privind radicalii liberi şi efectele radiaţiilor utilizate la conservarea produselor alimentare

15.3.2.1. Aspecte toxicologice privind radicalii liberi

Radicalii liberi sunt atomi sau molecule care prezintă unul sau mai mulţi electroni neîmperecheaţi. Datorită electronilor liberi, radicalii sunt foarte reactivi, putând reacţiona cu orice moleculă vecină, prin preluarea sau cedarea unui electron. În sistemele biologice, acţiunea radicalilor liberi se poate solda în consecinţă, cu distrugeri celulare şi tisulare importante.

Radicalii liberi se formează, fie prin clivare homolitică, fie prin pierdere sau acceptare de electroni.



Radicalii liberi se pot forma în urma uciderii microorganismelor de către fagocitele activate, în urma acţiunii enzimei ribonucleotid reductaza, prin scăpări

accidentale ale căilor transportoare de electroni, în urma unor procese de oxidare catalizate de metale, sub acțiunea unor compuși toxici etc.

Radicalii liberi formați în organism provin în cea mai mare parte de la oxigen. Cel mai frecvent este radicalul hidroxil ($OH^{\cdot}$), care datorită reactivității sale are și cea mai scurtă perioadă de viață. El poate lega inclusiv macromolecule, atunci când este produs la nivelul ficatului. Apariția lui se face prin intermediul peroxidului de hidrogen și a metalelor tranziționale (Reacția Fenton), precum fierul:

$$HOOH + Fe^{2+} \dashrightarrow HO\bullet + OH^{-} + Fe^{3+}$$

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \dashrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

Pentru organism este foarte important să păstreze fierul legat de proteine, astfel încât implicarea lui în reacții de tip Fenton să fie cât mai redusă.

Alți radicali liberi, des întâlniți în organism, sunt radicalul superoxid ($O_2^{\cdot -}$) și radicalul monooxid de azot ($NO^{\cdot}$).

Radicalii pot reacționa, cu alți radicali, ca în cazul reacției dintre radicalul superoxid și radicalul monooxid de azot, cu formarea unui oxidant puternic [peroxidul de azot ($ONOO^{-}$)].

Cele mai importante reacții sunt însă cele realizate cu diverse substanțe nonradicalice, așa cum sunt:

- **lipidele** – aceste reacții pot avea loc la nivelul membranelor celulare, bogate în acizi grași polinesaturați. Radicalii liberi au afinitate pentru electronii atomilor de hidrogen din catena hidrocarbonată a acizilor grași, determinând apariția unui radical hidrocarbonat. Radicalul hidrocarbonat reacționează cu oxigenul formându-se un radical peroxil. Radicalul peroxil poate intra în reacție cu atomi de hidrogen legați de atomii de carbon vecini, formând un peroxid lipidic. Peroxidul lipidic determină ruperea membranei celulare și distrugerea celulei;

- **ADN** – radicalul hidroxil poate reacționa cu guanina, formând un radical hidroxiguaninic. Acesta se poate apoi transforma pe două căi: fie prin oxidare, ducând la formarea hidroxiguaninei și apariția de mutații genetice, fie prin reducere, caz în care se formează o guanină cu inel deschis, care blochează replicarea ADN.

Rolul antioxidanților în protejarea organismului de radicali liberi este foarte important. Printre antioxidanți enumerăm:

- enzime, precum superoxid dismutaza (SOD):

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^{+} \rightarrow H_2O + O_2$$

- vitamine, precum tocoferolul (TH) și acidul ascorbic:

$$TH + LO_2^{\cdot} \text{ (radical peroxil)} \rightarrow LO_2H + T^{\cdot}$$

Acidul ascorbic poate recicla tocoferolul, transformând în sens invers forma radical a acestuia ($T^{\bullet}$), la tocoferol (TH).

Formarea radicalilor liberi este prevenită de catalaze, glutation şi glutation peroxidaze (determină transformarea peroxidului de hidrogen în apă) şi de substanţele capabile să lege şi să menţină legate metalele tranziţionale, cum sunt fierul şi cuprul (transferina şi feritina pentru fier, respectiv ceruloplasmina şi albumina pentru cupru).

De asemenea, o serie de procese reparatorii enzimatice, contribuie direct sau indirect la prevenirea formării radicalilor liberi, anume: procesele reparatorii ale membranelor lipidice în care intervin lipaze, peroxidaze şi acil transferaze sau procesele reparatorii ale ADN.

Protecţia oferită de antioxidanţi este eficientă într-o măsură dependentă de nivelul stresului oxidativ la care este supus organismul. În cazul unui stres oxidativ puternic, bariera de antioxidanţi nu face faţă şi pot apărea o serie de injurii celulare şi tisulare sau chiar moartea.

Stresul oxidativ este produs de ischemie, traume, radiaţii (prin fisiune homolitică), infecţii, şi de unii toxici. În cazul toxicilor, producerea radicalilor liberi se poate datora:

1. acţiunii directe a toxicului, ca în cazul radicalului dioxid de azot ($NO_2^{\bullet}$). Acesta se găseşte în smogul fotochimic şi acţionează la nivelul sistemului respirator;

2. convertirii toxicului la radicali liberi, ca în cazul tetraclorurii de carbon (folosit ca solvent în industrie); convertirea solventului este realizată la nivelul sistemului citocrom P450.

$$CCl_4\text{-}cP450 \rightarrow Cl^{-} + CCl_3^{\bullet}$$
$$CCl_3^{\bullet} + O_2 \rightarrow CCl_3O_2^{\bullet}$$

$CCl_3O_2^{\bullet}$ leagă macromoleculele din ficat provocând toxicitate.

3. metabolizării toxicului, în urma căruia se formează radicali liberi; este cazul paraquatului şi al dixorubicinei, un agent folosit împotriva cancerului (dixorubicina este metabolizată la semiquinone, care reacţionează cu oxigenul molecular şi formează radicali superoxid).

În prezent, se estimează că radicalii liberi sunt implicaţi în peste 100 de boli din sfera bolilor cardiovasculare, neurodegenerative şi oncologice.

15.3.2.2. Efectele radiaţiilor utilizate la conservarea produselor alimentare

Iradierea alimentelor este o metodă de conservare a acestora, care exploatează potenţialul de acţiune a radicalilor liberi asupra microorganismelor, organismelor pluricelulare parazite sau asupra proceselor fiziologice ce au loc în alimentele de origine vegetală, în vederea păstrării calităţilor iniţiale, optime de consum ale acestora.

Iradierea este astfel concepută, încât să nu determine creşterea nivelului de radiaţii ale alimentelor, dar să prevină diviziunea microorganismelor care produc alterări, prin lezarea structurii moleculare a unor componenţi biochimici ai

acestora, care sunt implicați în aceste procese. Ele pot de asemenea, să afecteze o serie de procese fiziologice ale alimentelor, cum sunt procesele de germinare, înmugurire și coacere.

Pentru iradierea alimentelor sunt folosiți în prezent radionuclizii de Cobalt-60 și Cesiu-137. Radionuclidul de cobalt-60 este cel mai des utilizat, deoarece are o perioadă de înjumătățire de 3-5 ani, iar radiațiile gama pe care le emite au un grad de penetrabilitate mare. Cesiu-137 are o perioadă de înjumătățire de 30 de ani.

Doza maximă de radiații, recomandată de Codex General Standard for Iradiated Foods, este de 10 kGy, energie echivalentă cu cantitatea de energie necesară creșterii temperaturii apei cu 2,4 grade Celsius.

În tabelul 15.9 sunt prezentate principalele aplicații ale iradierii, respectiv dozele uzuale pentru diferite tipuri de aplicații și produse.

Tabelul 15.9

Principalele aplicații ale iradierii alimentelor
(după *Facts about food irradiation –1999, International Consultative Group on Food Irradiation*)

Aplicații	Doze (kGy)	Produse alimentare
Doze scăzute		
Inhibarea înmuguririi	0,05 – 0,15	Cartof, ceapă, usturoi, radacini de ghimbir, batat
Dezinsecție	0,15 – 0,50	Cereale, fructe proaspete și uscate, pește și carne uscată
Întârzierea unor procese fiziologice	0,25 – 1,00	Fructe și legume proaspete
Doze medii		
Creșterea periodei de valabilitate a produsului	1,00 – 3,00	Pește proaspăt, căpșuni, ciuperci
Eliminarea microorganismelor patogene	1,00 – 7, 00	Fructe de mare proaspete și congelate, carne proaspătă
Îmbunătățirea proprietăților tehnologice ale alimentelor	2,00 – 7,00	Struguri (creșterea cantității de suc), legume deshidratate (reducerea timpilor de coacere)
Doze mari		
Sterilizarea industrială (în combinație cu temperaturi ridicate)	30,00 – 50,00	Carne, păsări, fructe de mare, hrană preparată, diete de spital
Decontaminarea unor ingrediente și aditivi alimentari	10,00 – 50,00	Condimente, preparate enzimatice, gume naturale

Microorganismele sunt distruse de către radicalii OH•, formați în celulele acestora, sub acțiunea radiațiilor. Acești radicali interacționează cu acizii nucleici ai microorganismelor, determinând lezarea lanțurilor polinucleotidice și blocând replicarea.

Radicalii liberi formați pot interacționa și cu proteinele sau lipidele. Acidul palmitic este convertit la forma 2-dodecil-ciclobutanonă, formă care poate servi ca marker specific pentru alimentele iradiate.

Se pare că iradierea determină modificarea ritmului biosintezei micotoxinelor în culturile fungilor. O serie de studii au demonstrat creșterea producției de ochratoxine, în culturile de *Aspergillus ochraceus* iradiate. (*Paster N., Barkai-Golan R., Padova R, 1985, Effect of gamma radiation on ochratoxinproduction by the fungus Aspergillus ochraceus, J. Sci. Food. Agric., 36: 445-449*).

Totuși, datele existente sugerează că iradierea nu afectează creșterea producției de aflatoxine în alimentele supuse iradierii. Micotoxinele nu suferă transformări chimice semnificative la dozele aplicate uzual în iradierea hranei, ochratoxina pură dizolvată în alcool metilic, fiind stabilă chiar la doze de 75 kGy. Toxinele bacteriene sunt de asemenea stabile la acțiunea radiațiilor.

Deși au existat suspiciuni în ceea ce privește efectele toxice ale consumului de alimente iradiate, cea mai mare parte dintre studiile efectuate până în prezent, atât pe animale de laborator cât și pe oameni, nu au evidențiat influențe semnificative asupra unor parametri de sănătate precum: longevitatea, capacitatea de reproducție, incidența tumorilor etc. De asemenea, nu au fost raportate efecte genotoxice. Radicalii liberi formați în alimente în urma iradierii, sunt similari radicalilor care se formează în acestea în urma tratamentelor clasice, la care este supusă hrana, sau în urma proceselor de oxido-reducere, care se petrec în mod natural în alimente.

15.3.3. Intermediari toxici ai reacției Maillard

Reacția Maillard este denumirea unei succesiuni de reacții, în cursul cărora se formează principalii compuși de aromă și culoare a produselor alimentare tratate termic. În cursul acestor reacții se obțin însă și o serie de compuși cu acțiune toxică mutagenă și carcinogenă.

În figura 15.5 este prezentată schema generală a reacțiilor Maillard și principalele efecte biologice asociate acestora.

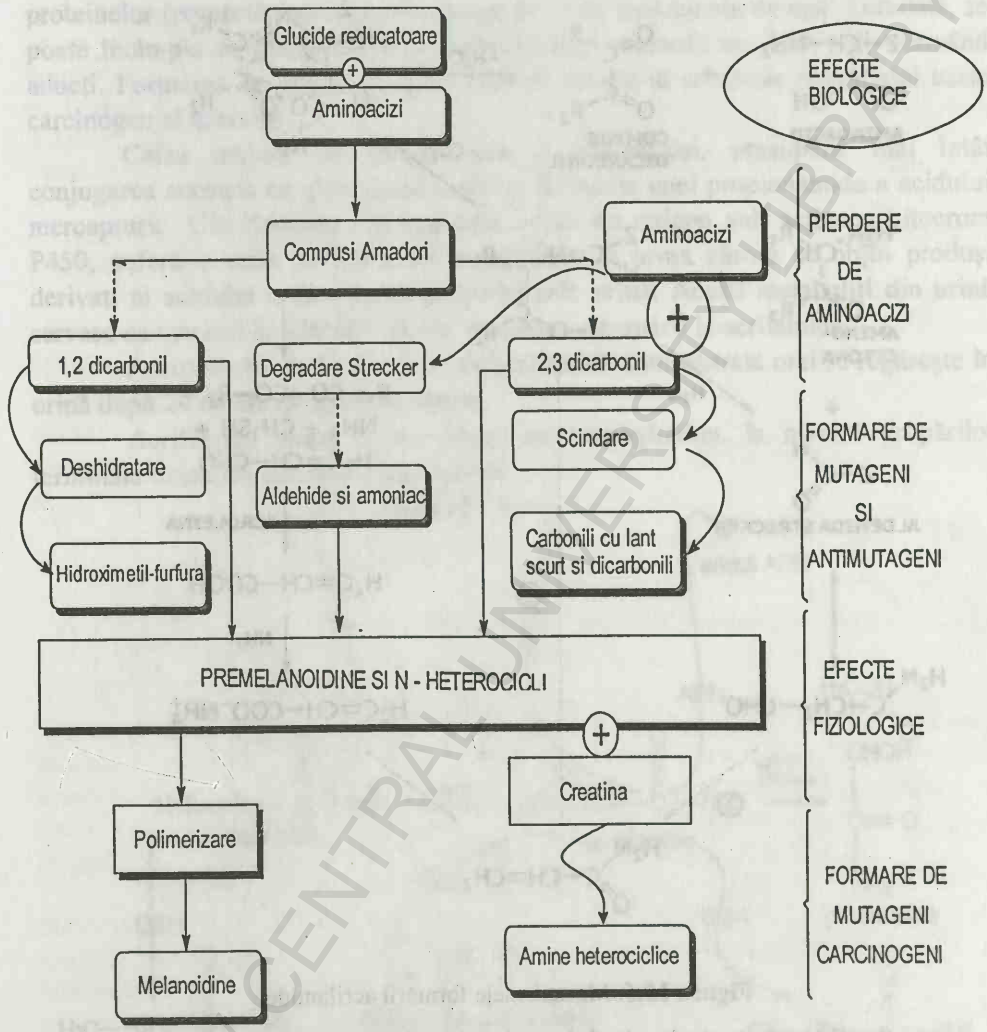


Figura 15.5. Schema generală a Reacției Maillard
(*după Banu C. și colab., 2000, Biotehnologii în industria alimentară, Ed. Tehnică, București*)

Unul dintre toxicii cei mai răspândiți în alimentele tratate termic, toxic format în urma secvențelor de reacții Maillard, este **acrilamida**.

Mecanismul formării acrilamidei, implică produșii de degradare Strecker ai aminoacizilor asparagină și metionină și produșii dicarbonilici formați în reacția Maillard. Compușii dicarbonilici pot apărea și ca urmare a autooxidării α – hidroxi-cetonelor.

O serie de studii au arătat că acrilamida se formează din asparagină și glucoză la temperaturi cuprinse între 100 și 170 de grade Celsius, printr-un mecanism care implică o serie de N-glicozide (figura 15.6).

TOMA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

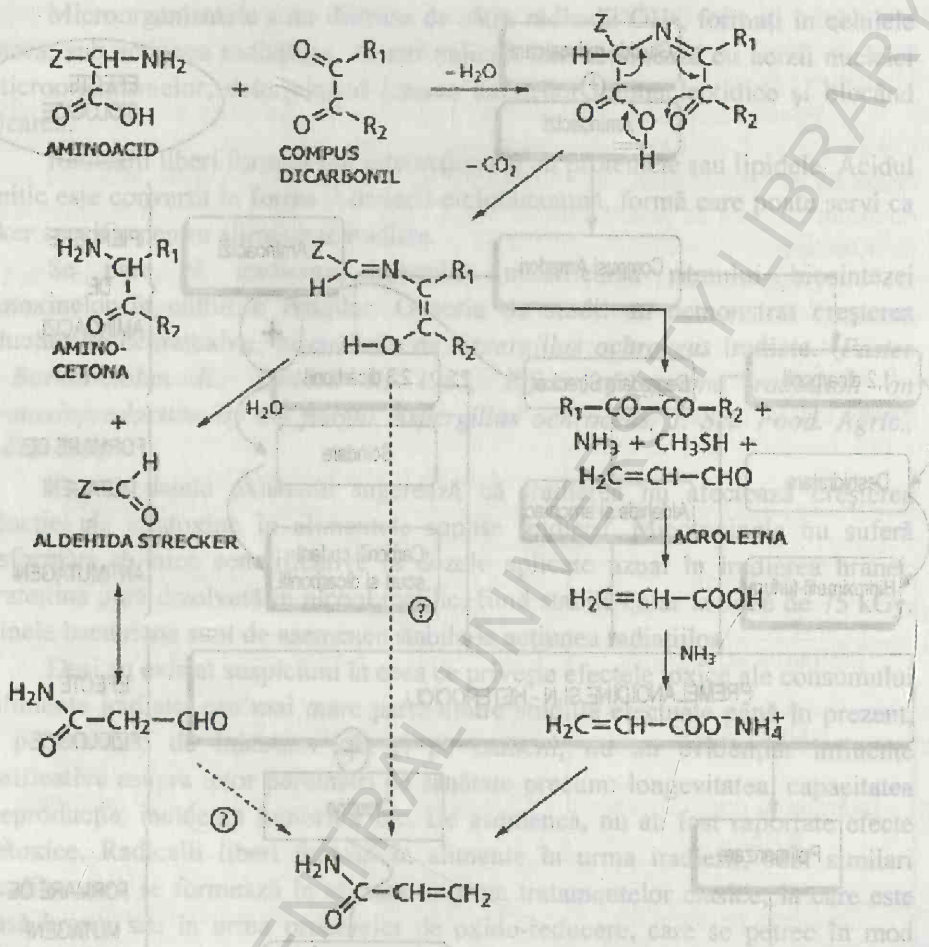


Figura 15.6. Mecanismele formării acrilamidei

Studiile efectuate la nivelul produselor alimentare accesibile Europenilor, au arătat niveluri ale concentrației acrilamidei foarte diferite, în produse precum: pâine, cereale pentru mic dejun, cafea, biscuiți, produse instant pentru copii, cartofi prăjiți etc.

Moleculele de acrilamidă conțin legături nesaturate, susceptibile de atacuri nucleofile, așa cum este adiția Michael. Acrilamida interacționează covalent "in vivo" cu substanțe nucleofile celulare, predominant cu grupările sulfhidril ale glutationului redus și ale proteinelor.

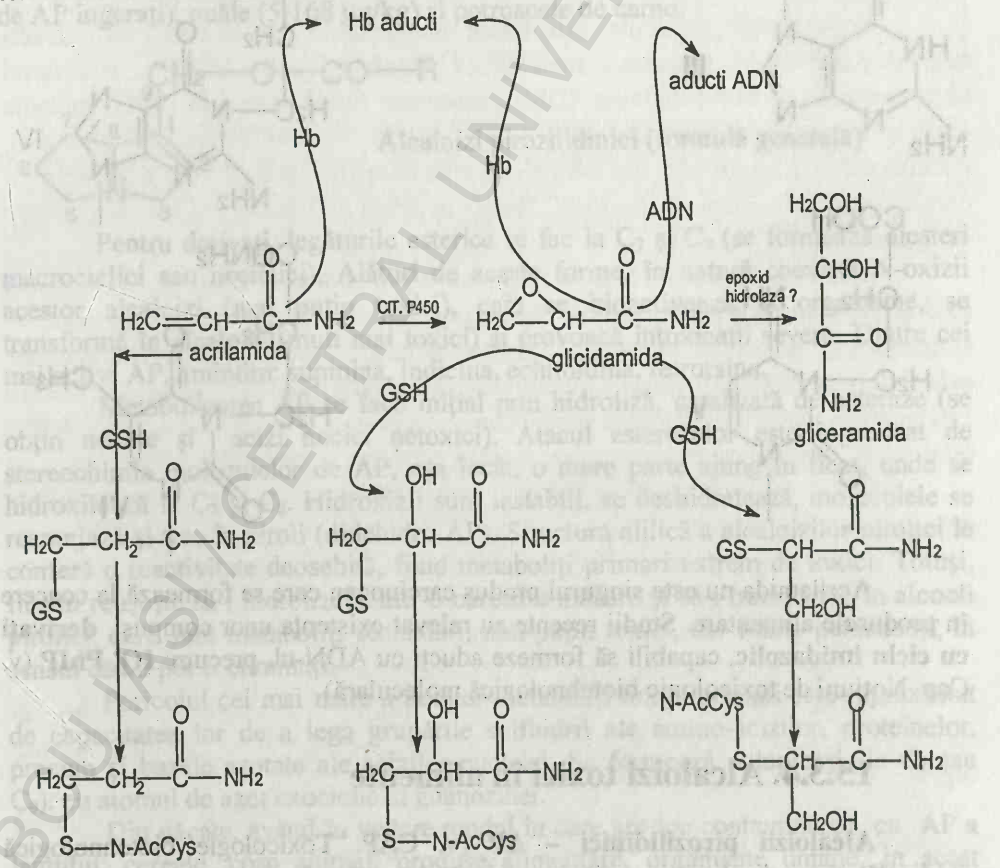
Acrilamida este absorbită în organism pe toate căile și este distribuită în toate țesuturile. Metabolizarea ei se realizează de către sistemul citocrom P 450 2E1, la un epoxid glicidamidă. Glicidamida este de asemenea supusă atacului nucleofil, la nivelul ciclului epoxidic, de către grupările sulfhidril sau amino ale

proteinelor (respectiv aminoacizilor), sau de către moleculele de apă. Totodată, se poate întâmpla ca glicidamida să interacţioneze nucleofil cu ADN –ul, formând aducţi. Formarea de aducţi cu ADN este de natură să confirme potenţialul toxic carcinogen al acesteia.

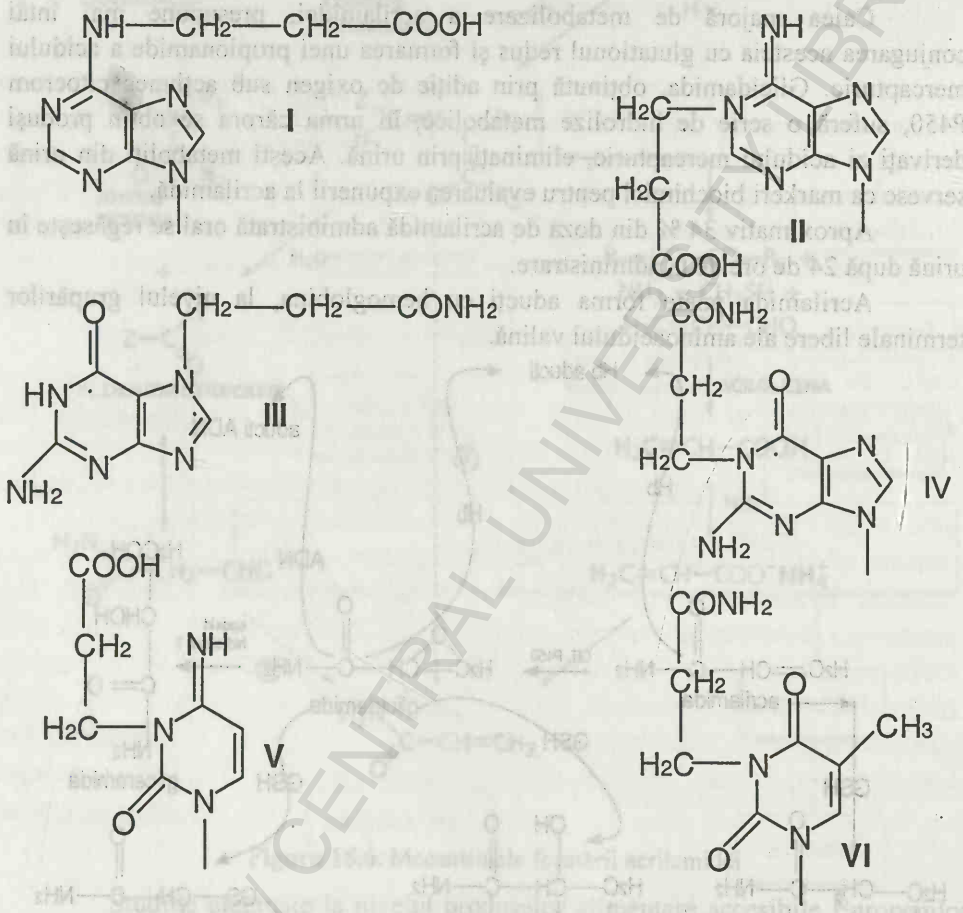
Calea majoră de metabolizare a acrilamidei, presupune mai întâi conjugarea acesteia cu glutationul redus şi formarea unei propionamide a acidului mercapturic. Glicidamida, obţinută prin adiţie de oxigen sub acţiunea citocrom P450, suferă o serie de hidrolize metabolice, în urma cărora se obţin produşi derivaţi ai acidului mercapturic, eliminaţi prin urină. Aceşti metaboliţi din urină servesc ca markeri biochimici pentru evaluarea expunerii la acrilamidă.

Aproximativ 34 % din doza de acrilamidă administrată oral se regăseşte în urină după 24 de ore de la administrare.

Acrilamida poate forma aducţi cu hemoglobina, la nivelul grupărilor terminale libere ale aminoacidului valină.



Aducții pe care acrilamida îi formează cu ADN sunt de forma: N6-(2-carboxi-etil)-2'-deoxiadenozina (I), 1-(2-carboxi-etil)-2'-deoxiadenozina (II), 7-(2-formamido-etil)-guanina (III), 1-(2-carboxi-etil)-2'-deoxiguanozina (IV), 3-(2-carboxi-etil)-2'-deoxicitidina (V), 3-(2-formamido-etil)-2'-deoxitimidina (VI).



Acrilamida nu este singurul produs carcinogen care se formează la coacere în produsele alimentare. Studii recente au relevat existența unor compuși, **derivați cu ciclu imidazolic**, capabili să formeze aducți cu ADN-ul, precum: **IQ, PhIP** (v. Cap. Noțiuni de toxicologie biotehnologică moleculară).

15.3.4. Alcaloizi toxici în alimente

Alcaloizii pirozilidinici – AP (v. CAP. Toxicologie biotehnologică medicală și medical-veterinară) incriminați într-o serie de intoxicări serioase, produse în special în Australia, atât la om, cât și la animal, provin în principal din buruienile care cresc alături de culturile cerealiere, anume: Heliotropum europaeum, Echium plantagineum, Symphytum spp., Crotalaria retusa. Practic, 13

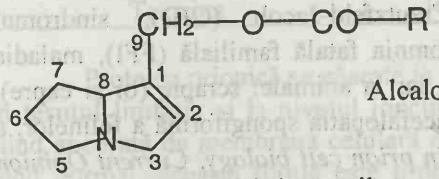
BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

familii de plante produc în cantităţi mai mari sau mai mici AP, dar la trei dintre ele cantităţile de alcaloizi sunt notabile (Compositae, Boraginaceae, Leguminaceae).

Toxicitate pentru om prezintă 1-hidroximetil-1,2-dehidropirolizidina, un hepatotoxic activ, care se transformă în compuşi pirolici. Aceşti compuşi electrofili determină de fapt, perturbările metabolice cele mai severe, afectând hepatocitul, sistemul circulator al ficatului, producând necroză hepatică şi ciroză. Pirolii formaţi atacă macromoleculele celulare, inclusiv punţile de sulf ale aducţilor proteici ai ADN. În acest context se incriminează efectul mutagenic şi carcinogenic pentru derivaţii alcaloizilor pirolizidinici, numiţi pirone. Acestea din urmă au un efect puternic antimitotic.

La om, s-a constatat că afecţiunile majore, legate de o ingestie cronică de AP, sunt circulatorii (ocluzii venoase). Doza de 1-hidroximetil-1,2-dehidropirolizidină care determină o intoxicaţie cronică este de 1μg/kg/zi.

Buruienile din care provin AP sunt utilizate uneori ca suplimente alimentare. Alimentele în care s-au găsit cantităţile cele mai mari de AP sunt: cerealele (50-6000 μg/kg), mierea, laptele (mai mult de 0,1 % din cantitatea totală de AP ingeraţi), ouăle (5-168 μg/kg) şi potroacele de carne.



Alcaloizi pirozilidinici (formulă generală)

Pentru derivaţi, legăturile esterice se fac la C_7 şi C_9 (se formează diesteri macrociclici sau neciclici). Alături de aceste forme, în natură coexistă N-oxizii acestor alcaloizi (mai puţin toxici), care se bioactivează în organisme, se transformă în alcaloizi (mult mai toxici) şi provoacă intoxicaţii severe. Dintre cei mai activi AP, amintim: supinina, indicina, echimidina, retrorsina.

Metabolizarea AP se face iniţial prin hidroliză, catalizată de esteraze (se obţin necine şi acizi necici netoxici). Atacul esterazelor este îngreunat de stereochimia moleculelor de AP, aşa încât, o mare parte ajung în ficat, unde se hidroxilează la C_3 şi C_8. Hidroxizii sunt instabili, se deshidratează, moleculele se rearanjază şi trec în piroli (didehidro AP). Structura alilică a alcaloizilor pirolici le conferă o reactivitate deosebită, fiind metaboliţi primari extrem de toxici. Totuşi, ficatul reuşeşte să-i hidrolizeze într-o oarecare măsură şi să-i transforme în alcooli pirolici, care sunt metaboliţi secundari, mai puţin toxici, dar foarte persistenţi, în sensul că nu pot fi eliminaţi.

Pericolul cel mai mare a acestor metaboliţi toxici primari este reprezentat de capacitatea lor de a lega grupările sulfhidril ale amino-acizilor, proteinelor, precum şi bazele azotate ale acizilor nucleici. Se formează complecşi (la C_7 sau C_9), cu atomul de azot exociclic al guanozinei.

Din păcate, având în vedere modul în care are loc contaminarea cu AP a lanţului: cereale, corp animal, produse alimentare, organisme umane, în acest moment nu se poate face o estimare exactă a riscurilor toxicologice, în vederea aplicării unor măsuri 100 % eficiente.

15.4. TOXICOLOGIE BIOTEHNOLOGICĂ MEDICALĂ ŞI MEDICAL-VETERINARĂ

Toxicologia biotehnologică medicală şi medical-veterinară abordează aspecte toxicologice referitoare la **nutriția umană, animală**, la **medicamentele** utilizate în terapia omului şi animalelor, la efectele **alcaloizilor toxici** din plante, preluați odată cu hrana, la **biotehnologiile de creştere şi reproducție** a animalelor. Deosebit de importante sunt **micologia, bacteriologia** şi **virusologia** specifică, cu toate urmările toxice ce derivă de aici. De asemenea, se acordă o importanță deosebită aspectelor toxice asociate unor **reacții imunologice** ale organismelor umane şi animale.

15.4.1. Toxicologia proteinelor prionice

Prionii sunt particule infecțioase responsabile de o serie de maladii neurodegenerative, precum: maladia Creutzfeld-Jacob (CJD), sindromul Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), insomnia fatală familială (FFI), maladia Kuru şi sindromul Alpers, în cazul omului, iar la animale: scrapie (oi şi capre), encefalopatia spongiformă bovină (BSE), encefalopatia spongiformă a felinelor, a cervidelor etc (*Brockes, P.,J., 1999, Topics in prion cell biology, Current Opinion in Neurobiology, 571-577*).

Noțiunea de prion a fost folosită pentru prima dată de către Prusiner, care a studiat encefalopatia spongiformă ovină, mai cunoscută sub numele de scrapie. Conceptul de prion rămâne totuşi o problemă extrem de controversată, deoarece prionii sunt entități infecțioase lipsite total de material genetic (ADN sau ARN). Declanşarea maladiilor prionice presupune conversia unor proteine normale (PrP^c), întâlnite în țesutul neuronal al tuturor mamiferelor, într-o mutantă (PrP^{Sc}).

Conversia proteinei normale într-o proteină anormală este determinată de o categorie largă de factori, incluzând:

- mutația genei pentru PrP, astfel încât se sintetizează o proteină anormală, cu o conformație rezistentă la atacul proteazelor endogene;
- consumul alimentelor contaminate;
- folosirea unor instrumente chirurgicale nesterile;
- injectarea unor hormoni derivați din hipofiza prelevată de la cadavre, căi care presupun modificarea conformațională a proteinelor prionice proprii organismului, în urma contactului acestora cu prioni exogeni.

Ipoteza naturii proteice a prionilor, pare a fi susținută de observațiile că aceştia rezistă la tratamente chimice şi fizice, care în mod normal distrug acizii nucleici (tabelul 15.10).

Tabelul 15.10

Efectele unor substanțe asupra proteinei prionice, responsabilă pentru scrapie

Tratament chimic	Concentrație	Scrapie
Et_2PC	10-20 mM	Inactivare
NH_2OH	0,1-0,5 mM	Nici o schimbare
Psoralen	10-500μg/ml	Nici o schimbare
Fenol	Saturată	Inactivare
SDS	1-10%	Inactivare
Zn^2+	2 mM	Nici o schimbare
Uree	3-8,M	Inactivare
Hidroxizi	PH 10	Inactivare
KSCN	1 M	Inactivare
Tratament enzimatic	**Concentrație**	**Scrapie**
RNA-aza A	0,1-100 μg/ml	Nici o schimbare
DNA-aza	100 μg/ml	Nici o schimbare
Proteinaza K	100 μg/ml	Inactivare
Tripsina	100 μg/ml	Inactivare

Proteina prionică se găseşte la nivelul sistemului nervos central şi periferic, în ţesutul limfatic şi la nivelul joncţiunilor neuromusculare, la suprafaţa celulei, fiind ancorată de membrana celulară prin intermediul unei ancore glicolipidice. In mod normal, această formă este produsă în creierul tuturor mamiferelor şi este inofensivă, însă în anumite condiţii poate adopta o formă alterată, care reprezintă agentul infecţios.

Agentul infecţios are capacitatea de a transforma proteinele prionice normale pe care le întâlneşte, în copii infecţioase. Aceste copii sunt depozitate la suprafaţa celulei, sub forma unor straturi (plăci amiloide), sau intracelular, sub forma unor agregate (fibrile) prionice (figura 15.7).

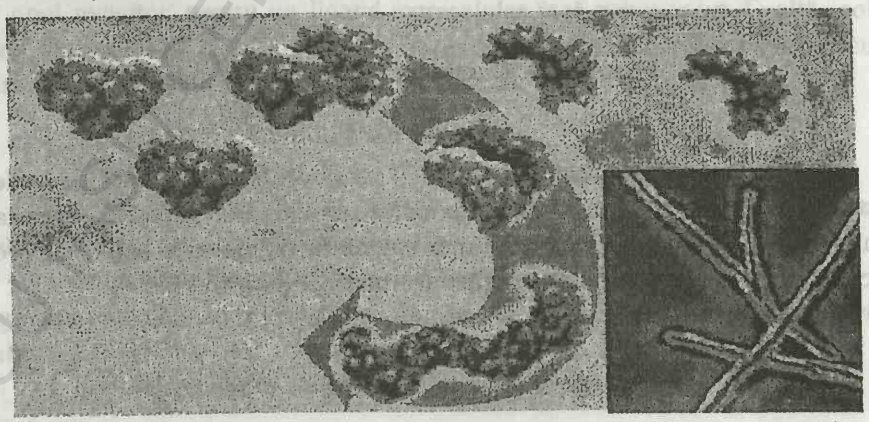


Figura 15.7. Proteine prionice

Proteina prionică este sintetizată sub forma unui precursor, de o genă situată pe cromozomul 20. Precursorul este o glicoproteină cu o greutate moleculară de 28 000 de daltoni, având o secvență de 208 – 220 de aminoacizi, în funcție de specie. Capătul N-terminal conține între 80 și 100 de aminoacizi și o regiune alcătuită din 5, 6 sau mai multe octarepetiții, la nivelul cărora se găsește un situs de legare pentru ionii de cupru (*Daggett, V., 1998, Structure-function aspects of prion proteins, Current Opinion in Biotechnology, 9, 359-365*).

Capătul C-terminal, conține 120 de aminoacizi, o secvență semnal pentru atașarea unei fosfatidil-inozitol glicolipide, prin care proteina se atașază de membrana celulară. De asemenea, la acest nivel se găsește o regiune cu două resturi de cisteină.

În urma unor procese translaționale, precursorul este glicozilat, formează punți disulfidice între resturile de cisteină, are loc o rearanjare a capetelor N- și C- terminale, se adiționează o fosfatidil-inozitol glicolipidă la capătul C-terminal și are loc mutarea primilor 57 de aminoacizi de la capătul N-terminal (figura 15.8).

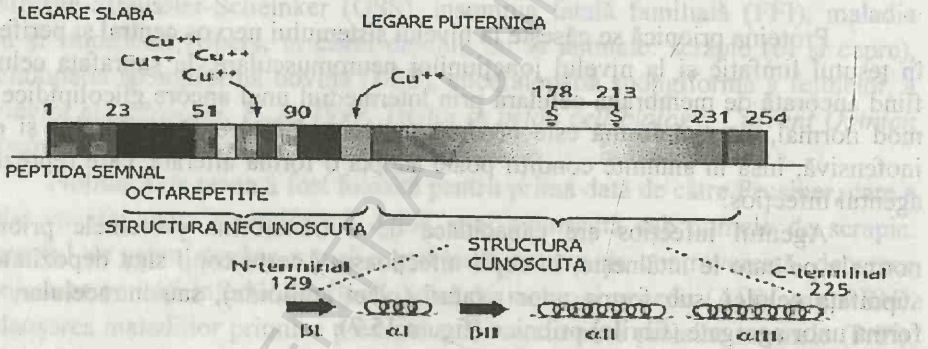


Figura 15.8. Structura glicoproteinei prionice

Proteina prionică patogenă (PrP^{Sc}) este identică din punct de vedere al secvenței de aminoacizi cu proteina prionică normală, dar diferă de aceasta prin conformație. Proteina normală este mai bogată în regiuni ά – helix, iar proteina prionică anormală este bogată în regiuni β – pliate (figura 15.9).

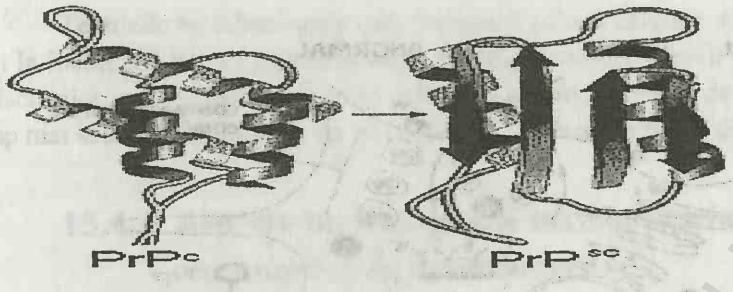
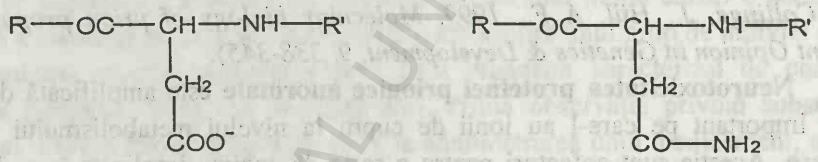


Figura 15.9. Conversia proteinei prionice normale în proteină prionică infecțioasă, prin conversia conformației ά – helix în conformație β – pliată

Modificările conformaționale sunt puse de către unii autori, pe seama unei mici diferențe la nivelul aminoacidului din poziția 178. Proteina normală prezintă în această poziție un rest aspartat, în timp ce proteina anormală are un rest de asparagină.



Rest aspartat Rest asparagină

Rolul prionilor în organism rămâne încă extrem de controversat. Prezența lor la suprafața exterioară a membranei celulare, a sugerat ipoteza că aceştia joacă rolul unui receptor, pentru un ligand extracelular încă necunoscut. O altă ipoteză susține că prionii ar fi implicați în transportul şi metabolizarea ionilor de cupru (figura 15.10), după un mecanism care presupune:

1. Sinteza moleculei proteice prionice;
2. Transportul prionului la nivelul membranei plasmatice;
3. Ancorarea acestuia de membrana celulară, prin intermediul ancorei fosfatidil-inozitol glicolipidice şi legarea ionului de cupru;
4. Înglobarea perechii prion-ion într-o veziculă endocitară formată prin învaginarea membranei plasmatice, transportul în celulă, şi eliberarea ionului metalic;
5. Pătrunderea proteinei prionice în lizozom şi degradarea acesteia.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

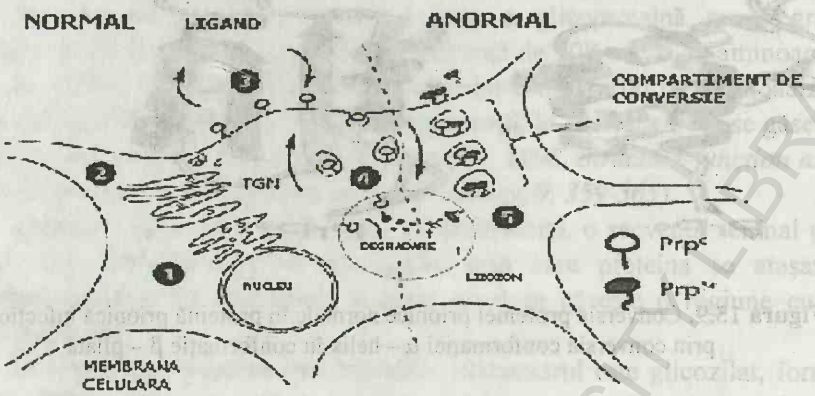


Figura 15.10. Mecanism ipotetic privind funcțiile fiziologice ale prionilor

În acest context, forma patogenă a prionului, rezistentă la proteaze, nu va fi degradată în lizozom şi se va acumula în celulă (*Wadsworth, J.,D.,F., Graham, S.,J., Collinge, J., Hill, A.,F., 1999, Molecular biology of prion propagation, Current Opinion in Genetics & Development, 9, 338-345*).

Neurotoxicitatea proteinei prionice anormale este amplificată de rolul foarte important pe care-l au ionii de cupru la nivelul metabolismului celulei nervoase. Aceştia sunt cofactori pentru o serie de enzime implicate în reducerea stresului oxidativ, prin anihilarea radicalilor liberi de oxigen. O serie de studii sugerează că însăşi proteina prionică normală ar putea avea activitate superoxid dismutazică, activitate mediată de aptitudinea ei de a lega ionii de cupru (*Graham, S.,J., Clarke, A.,R.., 2000, Mammalian prion proteins, Current Opinion in Structural Biology, 10, 69-74).*

15.4.2. Implicații biotehnologice ale prionilor

Encefalopatiile spongiforme transmisibile au avut la sfârşitul secolului trecut implicații profunde asupra politicilor agricole, asupra strategiilor de cercetare, precum şi asupra atitudinii consumatorilor față de o largă categorie de produse.

Biotehnologiile zootehnice sunt invitate astfel să ofere noi modalități de furajare a animalelor, care să păstreze aportul proteic necesar, în lipsa concentratelor proteice, deoarece acestea pot conține proteine de natură animală, susceptibile de a transmite boala.

Tehnicile biotehnologice care utilizează culturi celulare sunt metodele cele mai la îndemână pentru studiul acestor maladii, deoarece permit controlul eficient al factorilor care acționează la nivel celular și permit obținerea de rezultate, într-un timp mai scurt decât tehnicile de cercetare care folosesc animale de laborator.

15.4.3. Aspecte toxicologice și toxicogenetice ale consumului de medicamente

O serie de produse cu acțiune terapeutică au fost incriminate pentru efectele lor nefaste asupra sănătății umane. Costurile necesare tratamentului milioanelor de cazuri de indivizi cu reacții adverse la diferite tratamente medicamentoase se ridică anual la cifre impresionante. În anul 2000 se estima că aproximativ 8 % din populația Statelor Unite prezenta reacții toxice ca urmare a consumului de medicamente. Evaluarea riscului toxicologic pe care îl reprezintă o substanță cu acțiune farmaceutică, în momentul punerii sale pe piață, este cel puțin la fel de dificil de realizat ca și în cazul produselor modificate genetic. Rezultatul testelor de siguranță a consumului, exprimă în cele mai multe cazuri o estimație statistică a efectelor pe care substanța nouă o are asupra unui grup de indivizi și nu poate anticipa efectele acesteia asupra unui organism caracterizat de condiții specifice (genotip, dietă, stil de viață etc). Prima observație privind substratul genetic al reacției toxice (toxicogenetic), la administrarea unui medicament, a fost făcută acum 40 de ani, când s-a observat că unii pacienți tratați cu succinil-colină (relaxant muscular), prezentau intoleranță la aceasta. Cercetările efectuate au arătat că intoleranța se datora unui defect ereditar care afecta metabolismul succinil-colinei, defect datorat unei forme genetic atipice a butiril-colinesterazei (pseudocolinesterazei), enzima care hidrolizează în organism succinil-colina. Ulterior, au fost descrise o serie de aspecte toxicogenetice ale metabolismului unor medicamente pe bază de tiopurine, așa cum sunt 6-mercaptopurina și azotiopurina. Catabolismul acestor medicamente este catalizat într-o primă fază de enzima Citocrom P 450 (CYP) 2D6, iar într-o a doua fază de enzima tiopurin-metil transferază (TMPT). În cazul pacienților caucazieni, homozigoți pentru alela care determină o activitate extrem de scăzută a TMPT, s-a constatat o creștere a intoleranței la medicamentele pe bază de tiopurine.

Reacțiile adverse la medicamente pot fi clasificate în reacții imunologice și reacții neimunologice. Majoritatea reacțiilor adverse aparțin celei din urmă categorii. Reacțiile imunologice se împart conform sistemului de clasificare întocmit de Gell și Coombs în 4 categorii: IgE mediate, citotoxice, de tip complex imun și reacții întârziate, mediate celular. (tabelul 15.11).

Tabelul 15.11

Clasificarea diverselor tipuri de reacții adverse la medicamente
(după Marc A. Riedi, M.D. and Adrian M. Cassilas, M.D., 2003, Adverse drug reactions: Types and Treatment Options, American Family Physician, vol 68, number 9)

Tipul reacției		Exemple/Observații
Reacții imunologice	Tip I (IgE mediate)	Anafilaxia provocată de antibioticele β lactamice. Reacțiile adverse se instalează la câteva minute sau ore după expunerea la medicament. Reacțiile includ: urticarie, prurit, vomă, diaree, bronhospasm, anafilaxie etc.
	Tip II (Citotoxice)	Anemia hemolitică provocată de penicilină, neutropenia, trombocitopenia. Timp de reacție variabil.
	Tip III (complex imun)	Boala serului provocată de globulinele antitimocite, febră, erupții cutanate, limfadenopatie, urticarie, glomerulonefrite. Se manifestă la 1 – 3 săptămâni după expunerea la medicament.
	Tip IV (întârziate mediate celular)	Dermatite de contact, erupții maculopalpulare provocate de antihistamine. Se manifestă după 2 – 7 zile de la expunerea cutanată la medicament.
	Activarea specifică a celulelor T	Erupțiile provocate de sulfonamide.
	Fas/Fas ligand – inducerea apoptozei	Sindromul Stevens – Jhonson, necroza toxică a epidermei.
	Altele	Sindromul lupus.
Neimunologice	Hepatotoxicitate	Metotrexat.
	Interacții medicament-medicament	Interacția dintre teofilină și eritromicină.
	Supradozări	Lidocaina
	Idiosincrazii	La pacienții cu deficiență de glucozo-6-fosfat dehidrogenază, tratați cu primaquin.
	Intoleranță	Acufenă (țiuit în urechi) la aspirină

Importanța factorului genetic în evaluarea riscurilor pe care le presupune consumul unor medicamente, a fost confirmată în cazul unor medicamente precum: Olanzapina, Sertralina și Paroxetina. Aceste se găsesc pe lista primelor 10 medicamente ca număr de reacții adverse înregistrate în Statele Unite (*Dennis J.*

O'Kane, Richard M. Veinshilboum, Thomas P. Moyer, 2003, Pharmacogenomics and reducing the frequency of adverse drug events, Pharmacogenomics).

Metabolizarea paroxetinei este controlată de o genă cu un înalt grad de polimorfism, aunme CPY2D6. La indivizii caracterizaţi printr-o activitate scăzută a enzimei codate de gena CPY2D6, riscul apariţiei reacţiilor toxice la tratamentul cu paroxetină este foarte mare. Pe de altă parte, indivizii care prezintă o activitate prea intensă a enzimei nu pot beneficia de toate avantajele tratamentului cu paroxetină, deşi prezintă un risc scăzut la eventuale reacţii toxice generate de aceasta.

Studiile efectuate asupra genei CPY2D6 au arătat că enzima controlată de aceasta poate fi inhibată de o mulţime de alte substanţe xenobiotice, incluzând printre ele atât medicamente care necesită prescripţie, cât şi aşa numitele substanţe cu acţiune farmaceutică ce nu necesită prescripţie medicală (nutraceutice). Prin urmare, o persoană care prezintă un risc scăzut la tratamentul cu paroxetină, poate avea reacţii toxice la aceasta, dacă urmează în paralel tratamente cu inhibitori ai enzimei CPY2D6.

Paroxetina nu inhibă numai enzima CPY2D6, dar şi o enzimă polimorfă numită CPY2C9, implicată în metabolizarea unui anticoagulant sanguin (S – wafarina). Circa 30 % din populaţia caucaziană este heterozigotă pentru una sau mai multe polimorfe CPY2C9. Prin urmare, riscul apariţiei de sângerări la pacienţii care îşi administrează o doză standard de S – wafarină poate creşte, dacă în paralel urmează tratamente cu paroxetină. (*Lee C.R., Goldstein J.A., 2002, Cytochrome P 450 2 Cp polymorphism: a comprehensive rewiev of the in vitro and human data. Pharmacogenomics 12, 251-263).*

O serie de mecanisme care implică proteine polimorfe, stau la baza transportului unor medicamente prin diferite ţesuturi epiteliale. Existenţa unor transportatori proteici polimorfi explică intensitatea diferită a acţiunii unui medicament, de la caz la caz. Astfel de transportatori sunt: proteina MPR2 (resistance associated protein isoform 2), care se găseşte sub forma unui anion şi o β-glicoproteină (PG), care se găseşte sub formă de cation. Un alt transportator proteic polimorf, proteina ABC (ATP binding cassette proteins), a fost asociat cu o serie de deficienţe ale transportului unor medicamente precum: digoxina, ciclosporina, fexofenadina şi inhibitorii de protează.

Pentru evitarea reacţiilor adverse la medicamente sunt necesare efectuarea de teste de laborator enzimatice, mai ales când se utilizează medicamente tiopurinice.

Un caz relativ recent este reprezentat de studiul biotransformării acetaminofenului, un medicament hepatotoxic, ce urmează două căi de biotransformare:

1. glucuronconjugarea şi sulfoconjugarea, de unde rezultă metaboliţi netoxici, execretabili;
2. producerea unor compuşi hepatotoxici, prin implicarea unor gene polimorfe, anume: CYP450 şi CYP2E1. Metaboliţii hepatotoxici

rezultați în urma unor reacții de oxidare și hidroxilare, se conjugă ulterior cu glutationul. Sinteza glutationului implică gama enzimatică *glutamil-cistein sintetază*, gamă care este din punct de vedere genetic polimorfă. De asemenea, o mulțime de enzime *glutation S transferaze*, implicate în reacțiile de conjugare cu glutation sunt de asemenea, polimorfe sau au alele comune nule.

Asocierea acestor polimorfisme, cu reacțiile adverse la acetaminofen la copii, nu este pe deplin elucidată, însă cercetările efectuate până în acest moment, în ceea ce privește substratul genetic al reacțiilor toxice la medicamente, a permis formularea concluziei că pentru înțelegerea și anticiparea acestora, este necesar atât studiul polimorfismelor receptorilor de medicamente, cât și studiul polimorfismelor transportorilor, a polimorfismelor enzimelor de metabolizare, respectiv studiul interacțiilor dintre diferite medicamente.

15.4.3.1. Aspecte toxice determinate de antibiotice

Medicamentele antimicrobiene au ca principii de acțiune, interferența cu anumite componente sau căi metabolice microbiene, așa cum sunt:

- peretele celular (penicilinele, cefalosporinele, vancomicina, bacitracinul, cicloserina, aztreonam, imipenem);
- membrana celulară (polimixinele, colistin, nistatin, amfotericina B);
- sinteza proteinelor (aminoglicozidele, spectinomicina, tetraciclinele, cloramfenicolul, clindamicina, eritromicina);
- sinteza acizilor nucleici (sulfonamidele, trimetroprim, sulfonele, pirimetaminele, ciprofloxacin, norfloxacin, acid nalidixic, rifampin).

Antibioticele sunt responsabile de o serie de reacții toxice, printre care cele mai frecvente sunt alergiile. Alergiile sunt reacții care implică mecanisme imunitare și se prezintă sub forma unei simptomatologii specifice. Cele mai frecvente reacții alergice la antibiotice includ: urticariile, erupțiile cutanate și pruritul. O serie de studii au demonstrat totuși că unele reacții adverse la antibiotice afectează și alte țesuturi decât pielea. Combinația dintre acidul clavulanic și amoxicilină a fost incriminată pentru hepatotoxicitate, iar dozele crescute de peniciline și cefalosporine, pentru hemolize și citopenii. Totuși, reacții alergice grave (de genul anafilaxiei) la tratamentul cu peniciline sunt considerate relativ rare, ele afectând un caz la 5000 – 10000 de pacienți.

Un antibiotic poate genera mai multe răspunsuri imune, așa cum mai mulți determinanți alergenici pot lua naștere de la un singur antibiotic. În cazul penicilinei au fost identificați mai mulți determinanți alergenici minori și un determinant alergenic major (figura 15.11).

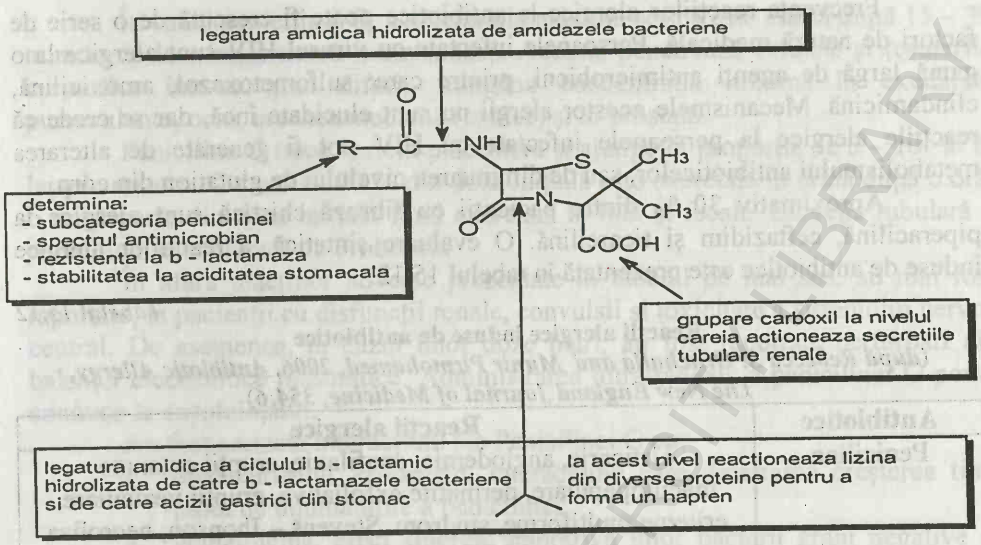
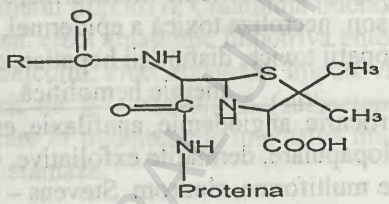
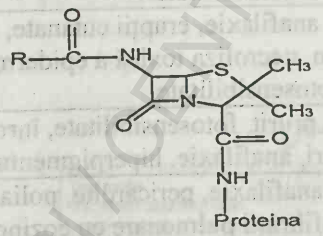


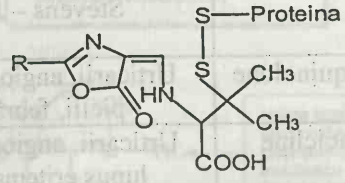
Figura 15.11. Structura generală a penicilinelor



Determinant major de tip peniciloil



Determinant minor de tip penicilanil



Determinant minor de tip penicilenat

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Frecvența reacțiilor alergice la antibiotice poate fi crescută de o serie de factori de natură medicală. Persoanele infectate cu virusul HIV sunt alergice la o gamă largă de agenți antimicrobieni, printre care: sulfometoxazol, amoxicilină, clindamicină. Mecanismele acestor alergii nu sunt elucidate încă, dar se crede că reacțiile alergice la persoanele infectate cu HIV pot fi generate de alterarea metabolismului antibioticelor, sau de diminuarea nivelului de glutation din corp.

Aproximativ 30 % dintre pacienții cu fibroză chistică sunt alergice la piperacilină, ceftazidim și ticarcilină. O evaluare sintetică, a reacțiilor alergice induse de antibiotice este prezentată în tabelul 15.12.

Tabelul 15.12

Reacții alergice induse de antibiotice
(după Rebecca S. Gruchalla and Munir Pirmohamed, 2006, Antibiotic Allergy, The New England Journal of Medicine, 354;6)

Antibiotice	Reacții alergice
Peniciline	Urticarie, angiodemie, anafilaxie, erupții cutanate maculopapulare, dermatite exfoliative, erupții veziculare, eriteme multiforme, sindrom Stevens – Jhonson, necroliza toxică a epidermei, boala serului, citopenii.
Cefalosporine	Urticarie, angiodemie, anafilaxie, erupții cutanate maculopapulare, eriteme multiforme, sindrom Stevens – Jhonson, necroliza toxică a epidermei, disfuncții renale, nefropatii toxice, disfuncții hepatice, anemie aplastică, anemie hemolitică.
Sulfonamide	Urticarie, angiodemie, anafilaxie, erupții cutanate maculopapulare, dermatite exfoliative, erupții veziculare, eriteme multiforme, sindrom Stevens – Jhonson, necroliza toxică a epidermei, boala serului, miocardite alergice, fotosensibilitate.
Macrolide	Urticarie, angiodemie, anafilaxie, erupții cutanate, sindrom Stevens – Jhonson, necroliza toxică a epidermei, fotosensibilitate.
Fluoroquinolone	Urticarii, angiodemie, prurit, fotosensibilitate, înroșiri ale pielii, febră, friguri, anafilaxie, hiperpigmentare.
Tetracicline	Urticarii, angiodemii, anafilaxie, pericardite, polialtralgii, lupus eritematos, infiltrații pulmonare cu eozinofile.
Vancomicine	Anafilaxie, febră, eozinofilie, erupții cutanate, dermatite exfoliative, sindrom Stevens – Jhonson, necroliza toxică a epidermei, vasculite.

Penicilinele. După cum se cunoaște, penicilinele diferă între ele prin stabilitatea în mediu acid. Unele sunt acid stabile și pot fi administrate oral (penicilina V, ampicilina, amoxicilina și penicilinele isoxazolice), iar altele sunt acid labile (penicilina G, meticilina, carbenicilina și ureidopenicilinele). Toate penicilinele sunt absorbite bine după administrare parenterală și distribuite în tot corpul. Penicilinele sunt parțial metabolizate și eliminate prin urină. Ele leagă aminoglicozidele și nu trebuie administrate simultan cu acestea.

În cazul penicilinei G, concentrația maximă serică este atinsă după 15 – 30 minute de la administrarea intravenoasă. Aceasta penetrează celulele și țesuturile corpurilor într-un grad diferit, atingând concentrația minimă în exudatele purverulente, ochi, urechea mediană (cohlee) și în prostată.

Penicilina G trece bariera placentară și ajunge în proporție de 5 – 10 % în laptele matern. Circa 60 – 90 % din doza inițială este excretată în urină după o oră, o mică parte din doza inițială fiind excretată în bilă și fecale. Excreția tubulară a penicilinei este blocată de Probencid.

În afara reacțiilor adverse prezentate în tabelul de mai sus, au mai fost raportate, la pacienții cu disfuncții renale, convulsii și toxicitate a sistemului nervos central. De asemenea, în cazul unor doze mari, au fost raportate perturbări ale balanței electrolitice plasmatice. Administrarea intratraheală a penicilinei G poate conduce la encefalopatii.

Au fost sesizate interacțiuni ale Penicilinei G cu:

- medicamentul Probencid, interacțiune care determină creșterea timpului de înjumătățire a penicilinei;
- gentamicina, efect sinergic împotriva unor bacterii gram negative și pozitive, aerobe;
- tetraciclinele și eritromicina, efect aditiv sau restrictiv asupra sinergismului împotriva Chlamidia trachomatis;
- amikacina, efect antagonic împotriva enterococilor;
- cloramfenicolul, efect antagonic împotriva pneumococilor meningitici;
- inhibitorii de β – lactamază (sulbactam, acid clavulanic), efect de amplificare în tratamentele împotriva microorganismelor producătoare de β – lactamaze.

Cefalosporinele. Au același mecanism de acțiune ca și penicilinele, fiind distribuite după absorție, în tot corpul (figura 15.12).

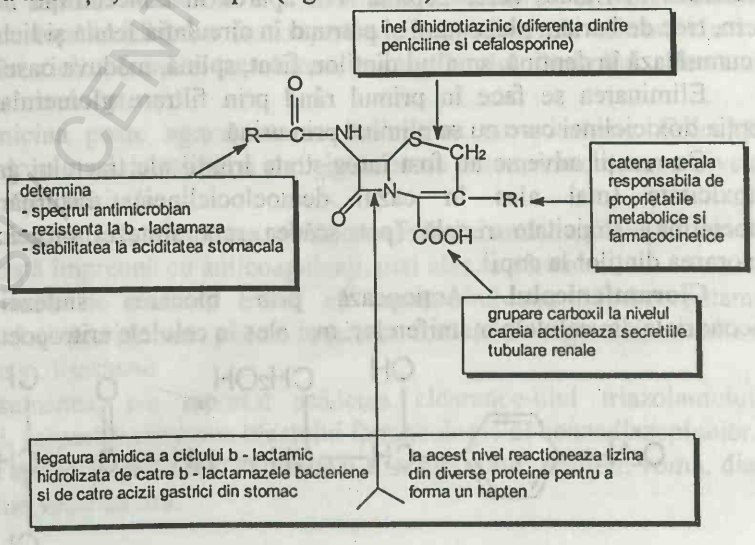


Figura 15.12. Structura generală a cefalosporinelor

Marea majoritate a cefalosporinelor sunt eliminate la nivel renal, cu excepția Cefaperazonei și Ceftriaxonei, care se elimină la nivelul tractului biliar. Cefalosporinele determină alergii la pacienții alergici la peniciline. Reacțiile adverse la aceste antibiotice se manifestă puternic la nivel renal și sanguin (disfuncții plachetare, hiperprotrombinemie, trombocitopenie). Cefaloridina a fost eliminată din tratamente datorită toxicității renale puternice.

Cefalosporinele au activitate sinergică când sunt combinate cu aminoglicozide în tratamentul infecțiilor provocate de Klebsiella.

Majoritatea antibioticelor β – bactamice sunt eliminate la nivel renal. Impinemul (antibiotic monobactamic) este hidrolizat de dipeptidazele care se găsesc în tubulii renali. De aceea, este uneori administrat împreună cu Cilastatina, care este un inhibitor al dipeptidazelor. Indivizii alergici la peniciline au arătat uneori reactivitate încrucișată cu Impinem. Ca reacții adverse la Impinem au fost raportate, greața și voma.

Polimixinele. Sunt antibiotice care acționează selectiv pe membranele celulare bogate în fosfatidil-etanolamine. Polimixinele sunt policationice, acționând ca un detergent, provocând ruperea membranei celulare. Deoarece conțin multiple sarcini pozitive, nu se absorb după administrare orală și nu sunt bine distribuite în organism. Sunt eliminate la nivel renal, în cazul lor fiind raportate cazuri de nefrotoxicitate și chiar neurotoxicitate.

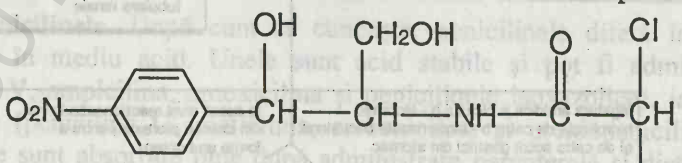
Tetraciclinele. Se absorb la nivelul tractului gastrointestinal, mai ales în stomac și mai puțin în intestin. Absorția lor este diminuată în cazul consumului de produse provenite din lapte, geluri de hidroxid de aluminiu, săruri de calciu și magneziu. De asemenea, preparatele pe bază de fier pot avea acțiune chelatoare asupra tetraciclinelor.

După absorție tetraciclinele se distribuie în toate țesuturile, putând să se concentreze în fluidul cerebrospinal. Pot apărea în concentrație mare în laptele matern, trec de bariera placentară și pătrund în circulația fetală și lichidul amniotic. Se acumulează în dentină, smaltul dinților, ficat, splină, măduva oaselor și oase.

Eliminarea se face în primul rând prin filtrare glomerulară (renal), cu excepția doxiciclinei care nu se elimină prin urină.

Ca reacții adverse au fost înregistrate iritații ale tractului gastrointestinal, fototoxicitate (mai ales în cazul democlociclinei), disturbări vestibulare (minociclina), toxicitate renală (pot scădea rata sintezei proteice în celule), decolorarea dinților la copii.

Cloramfenicolul. Acționează prin blocarea sintezei proteinelor mitocondriale din celulele mamiferelor, mai ales în celulele eritropoetice.



Cloramfenicol

Absorţia cloramfenicolului se face la nivelul tractului gastrointestinal. Succinatul de cloramfenicol se administrează parenteral.

Cloramfenicolul se distribuie în toate ţesuturile şi fluidele corpului, atingând concentraţii înalte în creier şi fluidul cerebrospinal. Trece bariera placentară, fiind identificat în laptele matern. Metabolizarea cloramfenicolului are loc în ficat, glucuronidul inactiv al acestuia fiind excretat prin urină. Nu se recomandă folosirea acestuia în tratarea pacienţilor cu ciroză hepatică.

Cele mai importante efecte toxice ale cloramfenicolului se manifestă la nivel sanguin (anemie aplastică) şi a măduvei osoase. Au fost raportate şi cazuri de toxicitate neonatală (sindromul copilului gri).

Macrolide. O serie de antibiotice macrolide interferă cu motilitatea gastrică, diviziunea celulară şi activitatea tumorală, fiind utilizate în diferite scopuri în gastroenterologie şi oncologie.

Absorţia lor are loc la nivelul tractului gastrointestinal. Macrolidele penetrează toate ţesuturile organismului şi sunt eliminate în fluidele mucoase, laptele matern, bilă şi urină. Majoritatea acestora inactivează enzime din sistemul Citocrom P 450 şi interferă cu medicamentele metabolizate la acest nivel. În cazul Claritomicinei, o serie de studii pe animale de laborator au raportat efecte teratogene.

Dintre macrolide, cel mai cunoscut antibiotic este **eritromicina**. Aceasta este concentrată în ficat şi eliminată prin bilă. Efectele disfuncţiilor hepatice asupra excreţiei biliare a eritromicinei nu sunt cunoscute. După administrare orală, numai 5 % din doza administrată poate fi identificată în urină. Eritromicina nu poate fi eliminată prin dializă peritoneală sau hemodializă.

Folosirea eritromicinei la pacienţii care urmează medicaţii cu substanţe metabolizate de sistemul citocrom P 450, a fost asociată cu creşterea nivelului plasmatic al acestora. Astfel, au fost raportate interacţiuni ale eritromicinei cu: carbamazepinele, ciclosporinele, tacrolimus, hexobarbitalul, fenitoina, alfentanilul, cisapridele, astemizolul etc.

Eritromicina poate agrava starea pacienţilor cu miastenie. Folosită în combinaţie cu doze mari de teofilină şi digoxin poate determina creşterea nivelului seric al acestora şi toxicitate.

A fost raportată de asemenea, creşterea efectului anticoagulant, atunci când a fost administrată împreună cu anticoagulanţi, mai ales la vârstnici.

La o serie de pacienţi trataţi cu ergotamină sau dihidroergotamină, eritromicina a fost incriminată pentru creşterea toxicităţii ergotului, manifestată prin vasospasm şi disestezie.

De asemenea, s-a raportat scăderea clearance-ului triazolamului şi midazolamului, respectiv creşterea efectului farmacologic al benzodiazepinelor. Ca efecte adverse specifice eritromicinei au mai fost raportate: ameţeli, vomă, diaree, anorexie, aritmie ventriculară.

Aminoglicozide. Se absorb la nivelul tractului gastrointestinal şi penetrează cu greu barierele biologice (au efect în sânge, lichide extracelulare şi urină).

Sunt excretate prin filtrare glomerulară. Efectele adverse sunt rare. Au fost raportate totuşi o serie de cazuri de nefrotoxicitate, necroze ale celulelor tubulare proximale, însoţite de disfuncţii renale reversibile, şi toxicitate vestibulară.

Fluoroquinolone. Afectează toxicocinetica substanţelor metabolizate de sistemul citocrom P 450. Nu sunt recomandate în tratarea femeilor gravide sau care alăptează şi a copiilor. În cazul acestor antibiotice au fost raportate cazuri de disturbări gastrointestinale, fotosensibilizare, leucopenii, trombocitopenii, spasme, tendinite, neurotoxicitate.

Nitroimidazoli. Sunt absorbiţi la nivelul tractului gastrointestinal de unde trec rapid prin toate barierele biologice (ajung până la creier şi chiar făt). Aproximativ 40 % din doza iniţială este metabolizată în ficat şi excretată prin urină. În cazul lor au fost raportate o serie de disfuncţii gastrointestinale (gust metalic, gură uscată) şi mai rar neurotoxicitate (ataxie, encefalopatie, neuropatie periferealã, apoplexie). O serie de studii de laborator au sugerat că aceste antibiotice ar putea avea efecte cancerigene, lucru care însă nu afost dovedit la om. Pot inhiba metabolismul anticoagulantelor orale.

Lincosamide. Sunt antibiotice care inhibă sinteza proteinelor ribozomale prin acelaşi mecanism ca şi macrolidele. Se absorb la nivelul tractului gastrointestinal sau parenteral. Penetrează toate barierele biologice, dar nu ajung la creier. Sunt parţial metabolizate de ficat şi sunt excretate prin urină. Produc în general perturbări gastrointestinale.

Sulfometoxazol şi Trimetoprim. Ambele sunt inhibitori ai metabolismului acidului folic, acţiunea antimicrobiană a acestor două substanţe fiind combinată în diferse formule farmaceutice (Co-trimoxazol). Ambele componente se absorb la nivel gastrointestinal şi trec prin toate barierele biologice ale organismului, fiind parţial metabolizate în ficat şi eliminate prin urină.

Ca reacţii adverse au fost înregistrate: sindrom Stevens-Fhonson, anafilaxie, tulburări gastrointestinale, dureri de cap, hemotoxicitate, nefrotoxicitate şi fototoxicitate.

Sulfonamidele concurează pentru receptorii de bilirubină de pe albumina plasmatică şi ca urmare, pot determina creşterea nivelului seric al bilirubinei neconjugate.

Cicloserine. Acţionează prin inhibarea D alanil–D alanin sintetazei. Ca reacţii adverse au fost raportate o serie de reacţii neurologice (delir, confuzie). Interferă cu o serie de transaminaze.

Vancomicin. În cazul acestui antibiotic au fost înregistrate o serie de reacţii toxice constând în: pierderi ale auzului, înroşire şi apariţia de erupţii pe faţă, gât, trunchi şi extremităţi. Forma injectabilă poate determina hipotensiune şi şoc cardiac.

15.4.4. Toxicitatea alcaloizilor

Alcaloizii sunt compuşi azotaţi de origine vegetală cu structură heterociclică şi cu funcţie fiziologică încă controversată. Îi vom aminti la acest capitol, mai ales datorită nenumăratelor lor utilizări în domeniul medical şi farmaceutic.

În pricipiu, ei sunt caracteristici pentru o anumită specie sau pentru specii înrudite. O plantă conţine de obicei, mai mulţi alcaloizi cu structură asemănătoare. Alcaloizii se găsesc în principal, ca săruri ale unor acizi organici cum sunt acidul citric, acidul tartric, acidul malic, acidul oxalic şi mai rar, legaţi de acizi specifici precum: acidul fumaric în Fumariţă (Fumaria officinalis), acidul chelidonic în Rostopască (Chelidonium majus), acidul meconic în opiu. (*C.D. Neniţescu, 1974, Chimie Organică, vol. II, Ed. Did. Şi Ped. Bucureşti*).

Clasificarea alcaloizilor se poate face din punct de vedere chimic (structură), botanic (în funcţie de încadrarea sistematică a plantelor din care provin) şi farmacodinamic (în funcţie de modul în care acţionează asupra organismului: stimulenţi ai cortexului, stimulenţi ai sistemului vegetativ, stimulenţi ai musculaturii etc).

15.4.4.1. Căile de absorţie a alcaloizilor în organism

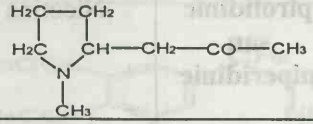
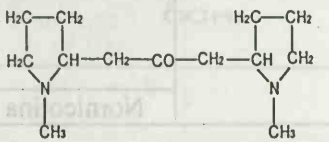
Alcaloizii, ca toate celelalte substanţe exogene, ajung în organism în urma traversării uneia sau unora dintre membranele biologice. Alcaloizii înghiţiţi străbat mucoasele tractului gastrointestinal, iar cei inhalaţi mucoasa căilor respiratorii. Transportul transmembranar al alcaloizilor poate fi realizat în urma mai multor tipuri de procese:

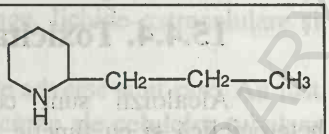
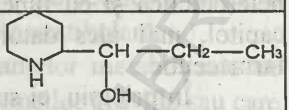
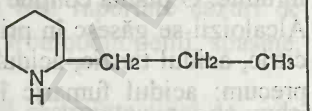
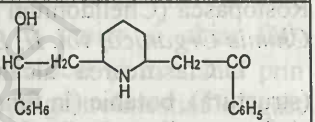
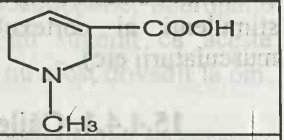
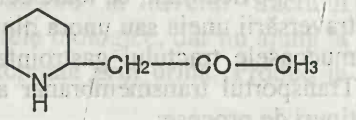
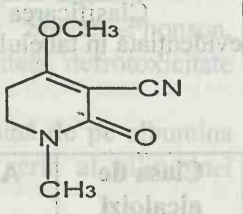
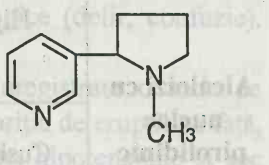
- procese pasive, care asigură trecerea moleculelor mici, hidrosolubile, prin flitrare şi a moleculelor mari, liposolubile, prin dizolvare în membrană (difuzie simplă);
- procese biochimice aşa cum este transportul activ şi cel facilitat;
- procese biologice, cum este pinocitoza.

Clasificarea alcaloizilor, funcţie de structură şi provenienţă, este evidenţiată în tabelul 15.13

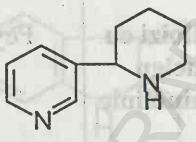
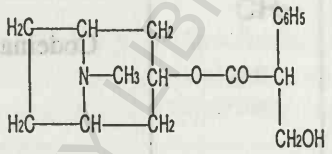
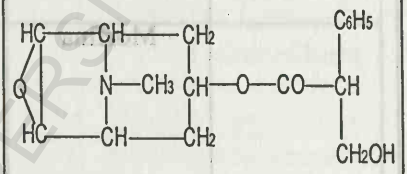
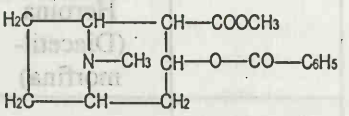
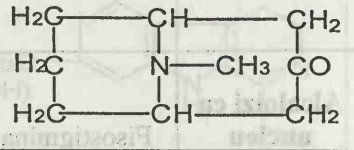
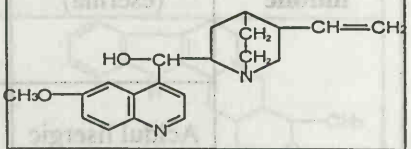
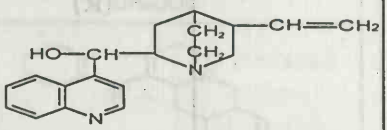
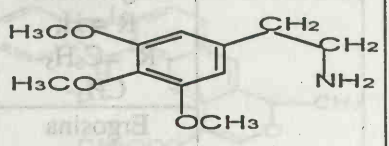
Tabelul 15.13

Clasificarea alcaloizilor

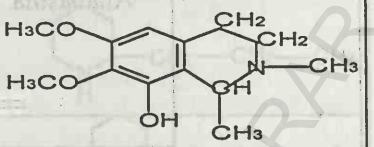
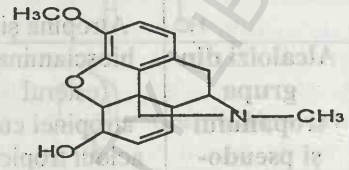
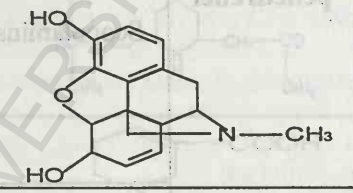
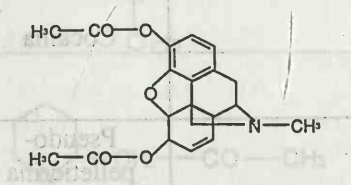
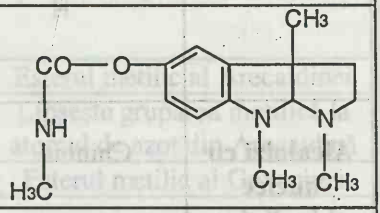
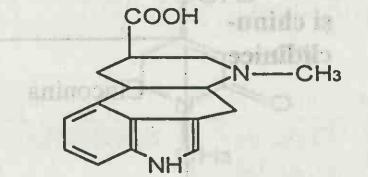
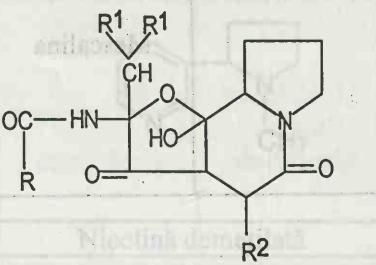
Clasa de alcaloizi	Alcaloidul	Planta de origine	Structura chimică
Alcaloizi cu nucleu pirolidinic	Higrina	Frunze de coca	
	Cushigrina	Frunzele de cusco boliviene	

Alcaloizi cu nucleu piperidinic sau piridinic	Coniina,	Cucută (Conium maculatum) **Pătrunjelul câinelui (Aethusa cynapium),** Rodul pământului (Arum maculatum)	
	Conhidrina		
	γ – Coniceina		
	Izopelletierina	Scoarța rădăcinii de rodiu (Punica granatum)	
	Lobelina	Lobelia inflata	
	Arecaidina	Nuca de betel (Areca catechu)	
	Arecolina		Esterul metilic al Arecaidinei
	Guvacina		Lipsește gruparea metilică la atomul de azot din Arecaidină
	Guvacolina		Esterul metilic al Guvacinei
Alcaloizi cu inel piridinic legat de un inel pirolidinic sau piperidinic	Ricinina	Ricin (Ricinus communis)	
	Nicotina	Tutun (Nicotiana tabacum)	
	Nornicotina		Nicotină demetilată

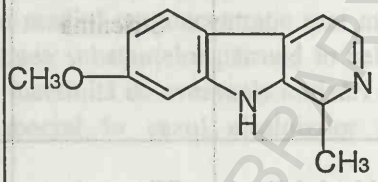
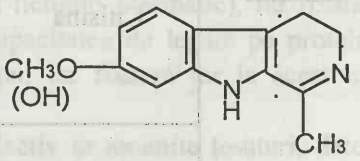
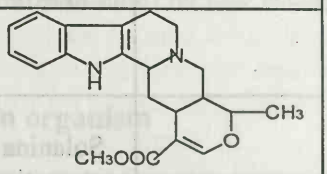
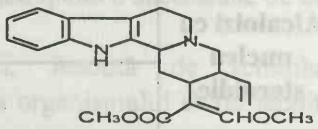
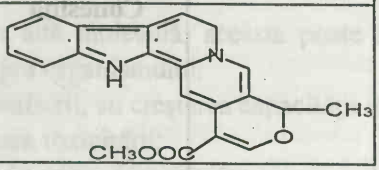
BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

	Anabasina	Anabasis aphyla	
Alcaloizi din grupa tropanului şi pseudo-pelletirenei	Atropina şi hiosciamina (esterul atropinei cu acidul tropic)	Mătrăgună (Atropa belladona), măselariţă (Hyoscyamus niger), laurul porcesc (Datura stramonium)	
	Scopolamina		
	Cocaina	Frunze de coca (Eruthroxylon coca)	
	Pseudo-pelletierina	Scoarţa rădăcinii de rodiu	
Alcaloizi cu nuclee chinolinice şi chinuclidinice	Chinina	Coaja unor arbori aparţinând speciilor Cincona şi Remijia	
	Cinconina		
	Mescalina	Specii de cactus din genul Anahalonium	

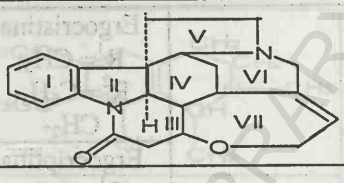
BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

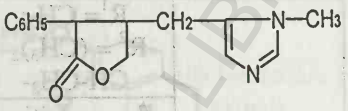
Alcaloizi cu nucleu izochinolinic	Peyotina		
	Codeina	Specii de mac, în special Papaver sominferum	
	Morfina		
	Heroina (Diacetil-morfina)		
Alcaloizi cu nucleu indolic	Fisostigmina (eserina)	Semințele de calabar (fructul viței americane Physostigma venenosum)	
	Acidul lisergic (R)		
	Ergotamina R^1= H; R^2 =C_6H_5-CH_2-	Alcaloizi din Claviceps purpurea (Ergot)	
	Ergosina R^1= H; R^2 = $(CH_3)_2$-CH-CH_2-		

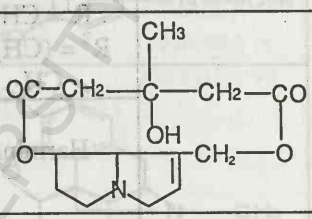
BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

	Ergocristina $R^1 = CH_3$; $R^2 = C_6H_5-CH_2-$		
	Ergocriptina $R^1 = CH_3$; $R^2 = (CH_3)_2-CH-CH_2-$		
	Ergocornitina $R^1 = CH_3$; $R^2 = (CH_3)_2-CH-$		
	Harmina	Peganum harmala, Anisteria caapi	
	Harmalina (Harmarol)		
	δ - Yohimbina	Pausinystalia yohimba	
	Corinanteina	Pseudo-cinchona africane	
	Serpentina	Rauwolfia serpentina	

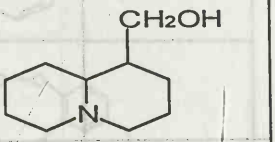
BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

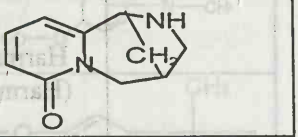


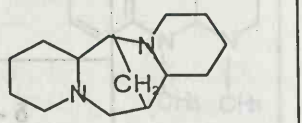


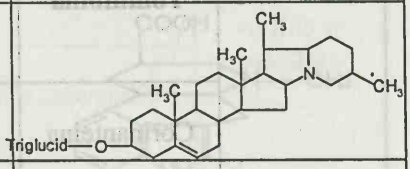


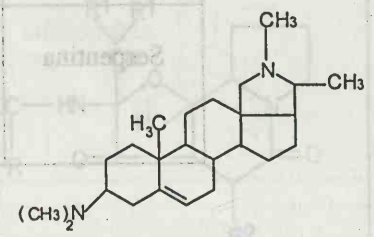
	Stricnina	Frunze de turta-lupului (Strychnos nux vomica)	
Alcaloizii cu nucleu imidazolic	Pilocarpina	Pilocarpus jaborandi şi Pilocarpus microphyllus	
Alcaloizi cu nucleu pirolizidinic	Dicrotalina	Crotalaria dura şi Crotalaria globifera	
Alcaloizi cu nucleu chino-lizidinic	Lupinina	Lupinus luteus, şi alte plante lupinaceae, salcâmul galben (Laburnum vulgare)	
	Citisina		
	Sparteina		
Alcaloizi cu nucleu steroidic	Solanina (şi tomatina)	Solanum lycopericum şi Solanum tuberosum	
	Conesina	**Cojile şi seminţele de Holarrhena antidysenterica**	











BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Difuzia simplă este caracteristică majorității substanțelor chimice neîncărcate electric și constă în trecerea substanței din mediul cu concentrație mai mare către mediul cu concentrație mai mică. Majoritatea substanțelor pătrund în celule prin acest sistem de transport, difuzia putând fi încetinită de eventuale ionizări sau interacțiuni cu proteinele membranare (în special în cazul alcaloizilor sau heterozizilor complecși).

Absorția alcaloizilor care ajung în organism pe cale gastrointestinală se realizează mai puțin la nivelul esofagului, stomacului și intestinului gros. Calea principală de acces în organism se găsește la nivelul intestinului subțire, datorită vascularizării intense și a suprafeței mari a mucoasei intestinale. Absorția la nivelul intestinului este mai puternică atunci când, ca urmare a modificărilor de pH, fracțiunea neionizabilă crește. La absorția fracțiunii neionizabile un rol esențial îl are și liposolubilitatea acesteia.

Accesul alcaloizilor în organism la nivelul căilor respiratorii este facilitat de rețeaua de capilare în care acestea difuzează rapid, ajungând apoi în venele pulmonare și de aici în organism. O serie de alcaloizi (cocaina) acționează prin traversarea conjuctivei și a corneei.

Calea intravenoasă asigură pătrunderea rapidă și completă a alcaloizilor, efectul acestora fiind influențat doar de modul în care se distribuie moleculele acestuia în sânge. După absorția în sânge, substanța rămâne un timp scurt în această fază, fie sub formă liberă (dizolvată în lichidul plasmatic), fie fixată pe hematii sau legată de proteinele plasmatice. Capacitatea de legare pe proteinele plasmatice este dependentă de natura substanței, iar fixarea lor la acest nivel întârzie biotransformarea acestora.

Majoritatea alcaloizilor se distribuie selectiv în anumite țesuturi, datorită faptului că permeabilitatea membranei celulare din diferite țesuturi nu este aceiași pentru toate substanțele.

15.4.4.2. Biotransformarea alcaloizilor în organism

Biotransformarea alcaloizilor în organism presupune o succesiune de etape prin care se urmărește:

- transformarea moleculei alcaloidului, însoțită de schimbarea proprietăților fizico-chimice, astfel încât traversarea organismului să fie facilitată, în vederea eliminării acesteia;
- transformarea moleculei de alcaloid în altă moleculă; aceasta poate fi eliminată ca atare sau exercită acțiunea toxică asupra organismului;
- transformarea moleculei în vederea detoxifierii, cu creșterea capacității de eliminare a acesteia și cu scăderea sau chiar anularea toxicității;
- transformarea moleculei alcaloidului, cu inactivarea acestuia.

Biotransformarea alcaloizilor se realizează ca în cazul tuturor toxicelor, în două etape (tabel 15.14). În prima etapă au loc transformări structurale menite să modifice proprietățile fizico-chimice ale alcaloidului sau să ducă la obținerea de metaboliți activi (reacții de oxidare, reducere, hidroliză). În a doua etapă se realizează transformări menite să detoxifice molecula de alcaloid (sinteze, conjugări).

Tabelul 15.14

Principalele tipuri de biotransformări ale alcaloizilor

Faza I	Faza II
Hidroxilarea catenei alifatice	Conjugarea glucuronică
Hidroxilare aromatică	Conjugarea cu acid sulfuric
N – oxidare	Conjugarea cu glicocolul
S - oxidare	Conjugarea cu glutamina
O - dezalchilare	Conjugarea cu cisteina sau glutationul
N - dezalchilare	Acetilare
Dezaminare oxidativă	Metilare
Înlocuirea sulfului cu oxigenul	Formare de tiocianați
Epoxidare	
Reducere	
Hidroliză	
Ciclizare	

Alcaloizii care prezintă asemănări cu substanțele proprii organismului suferă metabolizări catalizate de sistemele enzimatice fiziologice. În cazul alcaloizilor care nu au corespondență endogenă, metabolizarea este catalizată de enzime xenobiotice. Aceste enzime xenobiotice sunt în fapt sisteme enzimatice similare citocromului P 450, din membranele reticulului endoplasmatic hepatic.

În figura 15.13 sunt prezentate căile de metabolizare a alcaloizilor proveniți din opiacee. Se observă că detoxifierea se relizează prin intermediul glucuronconjugării. Circa 90 % din doza administrată se elimină pe diferite căi, cea mai mare parte (75 %) sub formă conjugată, prin urină (*Recommended methods for the detection and assay of drugs, in biological specimens, 1990, Manual for use by national laboratories, Madrid*).

Scurtă vreme de la consumare, **heroina** este rapid dezacetilată la monoacetil-morfină, care la rândul ei este hidrolizată la morfină, cu o rată redusă. Metaboliții majori ai heroinei, pot fi decelați în urină după 20 – 40 de ore de la administrarea intravenoasă în următoarele cantități: M-3-G (morfin-3-glucuronid), 38,2 % din doza inițială, morfină liberă 4,2 %, monoacetil-morfină 1,3 % și heroină nemetabolizată 0,1 %.

Alte căi de eliminare a heroinei şi derivaţilor sunt: transpiraţia, bila şi sucul gastric.

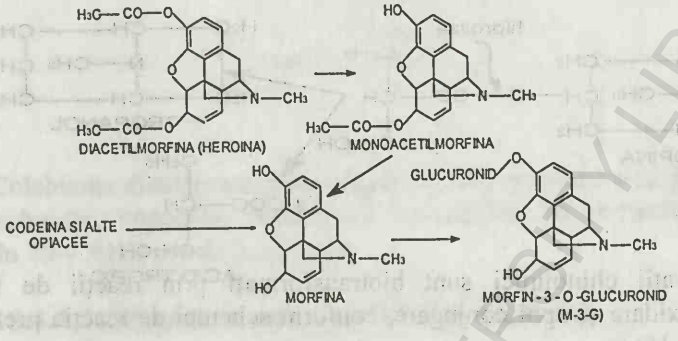


Figura 15.13. Calea de biotransformare a opiaceelor

Cocaina este transformată în organism în doi metaboliţi majori: benzoil-ecgonina şi esterul metilic al ecgoninei. Un alt metabolit minor este reprezentat de norcocaină, identificat recent în urina umană. Cocaina este eliminată prin urină: în proporţie de 1 – 9 % ca atare din doza administrată, 35 – 54 % ca benzoil-ecgonină şi 32 – 49 % ester metilic al ecgoninei (figura 15.14). Cea mai mare cantitate de cocaină, poate fi identificată în plasma sanguină, după administrarea intravenoasă şi în urma inhalării.

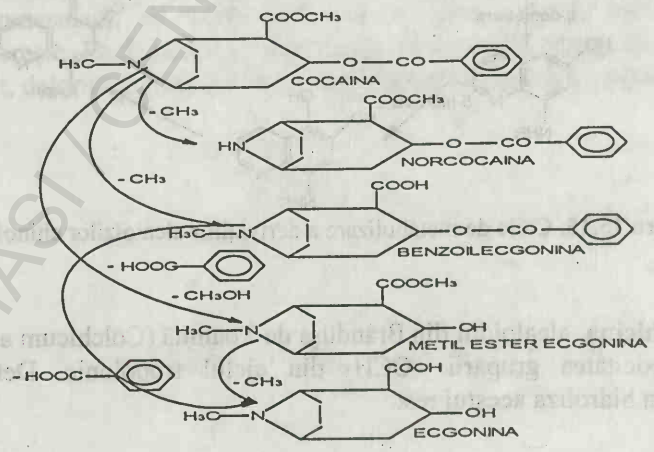
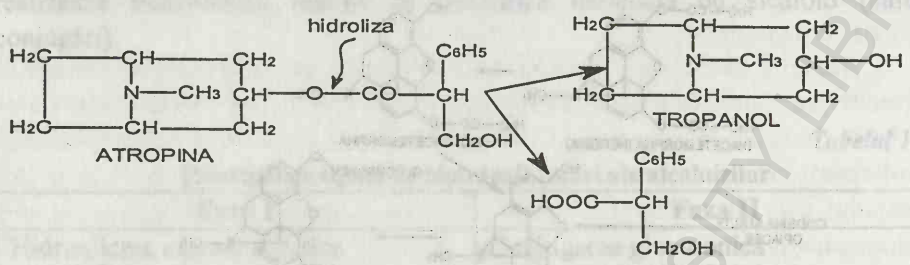


Figura 15.14. Căile de metabolizare a cocainei în organism

BCU IAŞI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

Alcaloizii din solanaceae, atropina, hyosciamina şi scopolamina, suferă în organism reacţii de hidroliză, în urma cărora esterii sunt hidrolizaţi la un acid şi un alcool. Atropina, care este esterul acidului tropic cu tropanolul, este biotransformată pe această cale, cu repeziciune, la iepure şi foarte greu în cazul organismului uman.



Derivaţii chinolinici sunt biotransformaţi prin reacţii de hidroxilare, demetilare, oxidare şi apoi conjugare, conform schemei de reacţie prezentate mai jos (figura 15.15):

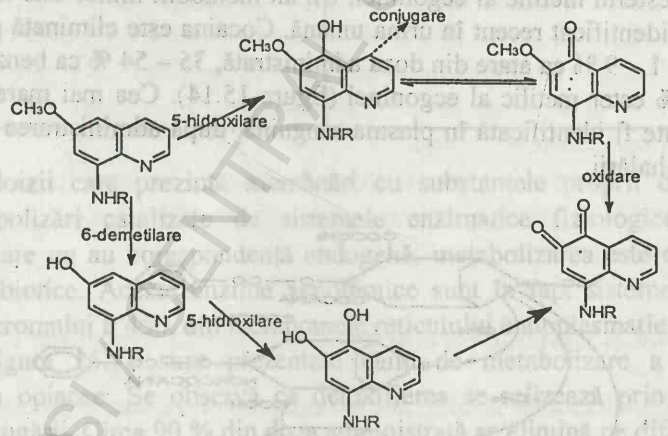
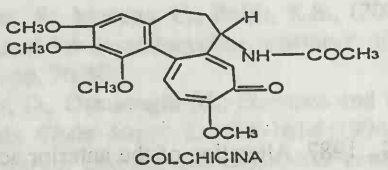


Figura 15.15. Căile de metabolizare a derivaţilor alcaloizilor chinolinici

Colchicina, alcaloidul din Brânduşa de Toamnă (Colchicum autumnale) îşi datorează toxicitatea grupării $-OCH_3$ din ciclul tropolonic. Detoxifierea se realizează prin hidroliza acestui rest.



COLCHICINA

Colchicina distruge celulele neoplazice, dar toxicitatea sa puternică o face de neîntrebuinţat împotriva cancerului. Are acţiune emetocardiacă, provocând moartea în 20 – 30 de ore de la ingestie.

15.4.4.3. Eliminarea alcaloizilor din organism

Alcaloizii pătrunşi în organism pot fi eliminaţi pe mai multe căi (dintre care una predominantă) şi sub diverse forme precum:

– alcaloid liber, nelegat de proteine şi nemetabolizat;

– metaboliţi ai alcaloidului, în număr şi proporţii diferite, activi sau inactivi;

– alcaloid sau metaboliţi ai acestuia, conjugaţi.

S-a stabilit ca eliminarea unui alcaloid este dependentă de o serie de factori cum ar fi: filtrarea glomerulară, reabsorţia tubulară, secreţia tubulară, legarea de proteine, şi tipul de metabolizare. Eliminarea unui alcaloid este invers proporţională cu volumul în care acesta este distribuit. Alcaloizii care difuzează uşor, în toate compartimentele hidrice ale organismului, dacă sunt reabsorbiţi în proporţie mare odată cu apa, se elimină greu. Dacă nu sunt reabsorbiţi, se elimină repede prin filtrare glomerulară, iar dacă sunt excretaţi prin secreţie tubulară, viteza de eliminare creşte. Dacă alcaloizii sunt legaţi de proteine, viteza de eliminare scade foarte mult, datorită volumului mare al complexului proteină – alcaloid.

BIBLIOGRAFIE

Aalseth E., P., Saacke R., G., 1987, Alteration of the anterior acrosome of motile bovine spermatozoa by fructose and by hydrogen ion concentration, J. Reprod. Fert., 81, p. 625.

Abbott, A., 2004, Microbiology: Gut reaction, *Nature*, no. 427, p. 284-286.

Adam G. and colab., 2006, Fusarium genomics activities in the Austrian genome program GEN-AU, Taxonomy, Population Genetics, and Genomics of Fusarium spp. (on line), Viena.

Ahrne S, Quednau M, Molin G 1996: Enterococci In Foods Spreading Antibiotics Resistance? *Livsmedelsteknik.* **38** (1/2): 42.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2002, *Molecular Biology of the Cell.* 4th ed., Garland Publishing House, New York.

Alexander N. J., McCormick, 2006, Functional analysis of trichothecene biosyntetic genes via heterologous expression in a trichothecene-nonproducing Fusarium species, Taxonomy, Population Genetics, and Genomics of Fusarium spp. (on line), Canada.

Alonso-Monge, R., Real, E., Wojda, I., Bebelman, J-P., Mager, W.H., Siderius, M., (2001), Hyperosmotic stress response and regulation of cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae* share common functional aspects, *Mol. Microbiol.*, **41**(3), pp. 717-730.

Alsomai N., Vishwanath R., Shamun P., Molon P., C., 1994, Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull semen, Repr. *Fert. and Develop.*, vol. 6:2, p. 165.

Anderson, S., Marks, C.B., Lazarus, R., Estell, D., 1985, Production of 2-keto-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis by genetically modified *Erwinia herbicola,* Science, 230, p. 144-149.

Anghel,I., 1993, *Biologia şi tehnologia drojdiilor*, Editura Tehnică.

Anwar, A., Saleemuddin, M., Alkaline proteases: a review, *Biores. Technol.*, 64, 175-183 (1998).

Apse, M.P., Blumwald, E., (2002), Engineering salt tolerance in plants, *Curr. Opin. Biotech.*, **13**, pp. 146-150.

Archer, D.B., Mackenzie, D.A., Jeenes, D.J., (2002), Genetic engineering: yeasts and filamentous fungi. În *Basic Biotechnology*, editată de Ratledge, C., Kristiansen, B., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 95-127.

Ashraf, M., (1994), Breeding for salinity tolerance in plants, *Crit. Rev. Plant Sci.*, **13**(1), pp. 17-42.

Attifield, P.V., Choi, H.Y., Veal, D.A., Bell, J.L., (2001), Heterogeneity of stress gene expression and stress resistance among individual cells of *Saccharomyces cerevisiae. Mol. Microbiol.* **40**(4), pp. 1000-1008.

Aubert C., *L'agriculture biologique*, Paris, 1970.

Ausubel, F.M., Brent, M.R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1987, *Current protocols in molecular biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Intersc., New York.

Avery, S.V., (2004), Phenotypic diversity and fungal fitness, *The Mycologist*, (în curs de publicare).

Avery, S.V., Malkapuram, S., Mateus, C., Babb, K.S., (2000) Copper/zinc-superoxide dismutase is required for oxytetracycline resistance of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **182**, pp. 76-80.

Avnir, D., Braun, S., Lev, O., Ottolenghi M., Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol – Gel Materials, *Chem. Mater.* 6, 1605-1614 (1994).

Bailer A. J., 2002, *Reportbrief, Dioxins and dioxin-like compounds in the food supply: strategies to decrease exposure*, Miami Univ. Oxford (on line), Ohio.

Bainbridge, B.W., 1980, The genetics of *Streptomyces*, in *The genetics of microbes*, Ed. Blackie, p. 165-175.

Bălăşcuţă N., *Protecţia plantelor de grădină cu deosebire prin mijloace naturale*, Editura Tipocant, Braşov, 1993.

Baldaro, E., D'Arrigo, P., Pedrocchi-Fantoni, G., Rossel, C.M., Servi, S., Pen-G acylase catalyzed resolution of phenylacetate esters of secondary alcohols, *Tetrahedron Asymm.*, 4, 1031-1034 (1993).

Balibrea, M.E., Rus-Alvarez, A.M., Bolarin, M.C., Perez-Alfocea, F., (1997), Fast changes in soluble carbohydrates and proline contents in tomato seedlings in response to ionic and non-ionic iso-osmotic stresses, *J. Plant Physiol.*, **151**, pp. 221-226.

Banu C. şi colab., 2000, *Biotehnologii în industria alimentară*, Ed. Tehnică, Bucureşti.

Barbas, C.F., Matos, J.R., West, J.B., Wong, C.H., Cosolvent-mediated conversion of proteases to esterases for irreversible synthesis of peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 5162-5166 (1988).

Barnett C.C., Berka R.M., Fowler T., Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular glucosidase from *Trichoderma reesei:* Evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates, *Biotechnology*, **9**, 562-567 (1991).

Basso, A., De Martin, L., Ebert, C., Gardossi, L., Tomat, A., Casarci, M., Li Rosi, O., A novel support for enzyme adsorbtion: properties and applications of aerogels in low water media, *Tetrahedron Letters*, 41, 8627-8630, (2000).

Bedell, B.A., Mozhaev, V.V., Clark, D.S., Dordik, J.S., Testing for diffusion limitations in salt-activated enzyme catalysts operating in organic solvents, *Biotechnol. Bioeng.*, 58, 654-657 (1998)

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002, *Biochemistry*, W. H. Freeman and Co., New York.

Bergersen, *Physiologie du Rhizobium*, 1978.

Bergman, A., Siegal, M.L., (2003) Evolutionary capacitance as a general feature of complex gene networks, *Nature*, **424**, pp. 549-552.

Bickerstaff, G. F., *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press, New Jersey, p. 1-355, 1997.

Blum, S., Renier, R., Schiffrin, E.J., et al. 1999. *Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement.* Trends Food Sci Techno*L.* **10**:405-410.

Blumwald, E., (2000), Na transport and salt tolerance in plants, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, pp. 146-150.

Boer, H.A., Constock, L.J., Vasser, M., 1983, The *tac* promoter: a functional hybrid derived from *trp* and *lac* promoters, PNAS, 80, 21-25.

Boesten, W.H.J., în *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Ed. by Drauz, K., Waldmann, H.,VCH, Weinheim, p. 376-393, 1995.

Bogdan, Al., Târnovean, I., Salanţiu, D., 1984, *Fertilitatea, natalitatea şi prolificitatea în Zootehnie*, Ed. Dacia Cluj-Napoca, vol. 1.

Bolsen K. K., Wilkinson Mike, Lin C. J., *Evolution of silage and silage inoculant*, Biotechnology in the Feed Industry, Alltech, Notthingham University Press, 453-472, (2000).

Bomba, A., Nemcova, R., Mudronova, D. And Guba, P., 2002, The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics, *Trends in Food Science & Technology*, no. 13, p. 121-126.

Bommarius, A.S., Groeger, U., în *Enzyme Catalysys in Organic Synthesis, A Comprehensive Handbook*, Ed. K. Drauz, H. Waldmann, WILEY-VCH Weinheim, p. 393-408, 1995.

Bommarius, A.S., Riebel, B.R., *Biocatalysis*, WILEY-VCH Weinheim, 2004.

Bonadonna, T., 1978, Observații privind desprinderea zonei acrozomice la spermatozoizi, *La Clinica Vet.*, vol. 101, nr. 6, p. 152.

Bonneil, E., Mercier, M., Waldron, KC., *Reproducibility of a solid-phase trypsin microreactor for peptide mapping by capillary electrophoresis*, Anal. Chim. Acta, 404 (1), 29-45 (2000).

Bourgaize, D., Jewell, T.R., Buiser, R.G., 2000, *Biotechnology – Demistifyind the concepts*, Benkamin/Cummings Ed.

Bray, E.A., (1993), Molecular responses to water deficit, *Plant Physiol.*, **103**, pp. 1035-1040.

Bretthauers, R.K., Castellino, E.J., 1999, Glzcoszlation of *Pichia pastoris* derived proteins, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30, 193-200.

Brockes P.J., 1999, Topics in prion cell biology, *Current Opinion in Neurobiology*, 571-577.

Brockwell, J., 1980. Experiments with crop and pasture legumes. Principle and practice, p. 417-488. In F. J. Bergersen, *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Broothaerts, W., Mitchell, H., Weir, B, Kaines, S., Smith, L. M. A., Yang, W., Mayer, J.E., Roa-Rodriguez, C., Jefferson, R.A., Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*, 433, 629-633, 2005.

Brown, L. *Depășind resursele planetei – probleme globale ale omenirii*, Editura Tehnică, 2005.

Brown, T.A., 2002, *Genomes*. 2nd ed., BIOS Scientific Publishers, Ltd, Oxford, UK.

Brown, A.D., (1978), Compatible solute and extreme water stress in eukaryotic microorganisms, *Adv. Microb. Physiol.*, **17**, pp. 181-242.

Bugrov, A.D., Sidashova, S.A., 1992, The effect of dead spermatozoa on the survival rate of live spermatozoa in freshly diluted and frozen sperm of bulls and boars, Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, Haga, vol. 2, p. 1396.

Burns, A.J. & Rowland, I.R., 2000, *Anti-carcinogenitiсy of probiotics and prebiotics*, Current Issues Intestinal Microbiology, no.1 (1): 13-24.

Buruiană, L., M., Gluhovski, N., 1956, Cercetări asupra activității tripsinice a spermei și semnificația ei, Studii și cercetări științifice, Acad. RSR, tom III, nr. 1-2, p. 63.

Buruiană, L., M., Khalil, H., Seiciu, Fl., Niculescu, H.S., 1980, *The influence of conservation by congelation upon the proteines, LDH and MDH on spermatozoa of bull*, The 9th International Congress on Animal Reproduction, Madrid, vol. 3, p. 424.

Burzo, I., Viorica Ana Voican, Viorica Luchian, *Fiziologia plantelor de cultură*, Vol. V., Fisiología plantelor legumicole, Editura Elisavaros, 2005.

Byung-Youl Oh, 2002, Pesticide residues for food safety and enviroment protection, Nation. Instit. of Agric. *Science Technology*, RDA, Suwon 441-707, Korea.

Cafe, M.B., Borges, C.A., Fritts, C.A., Waldroup, P.W., Avizyme improves performance of broilers fed corn-soybean meal-based diets, *Journal of Applied Poultry Research* 11 (1) : 29-33 (2002).

Campbell A.M., 1992, Chromosomal insertion sites for phages and plasmids. *Journal of Bacteriology* 174(23):7495-7499.

Canedi A., A., Bottino J., A., 1972, Stability of DNA-P content in bull spermatozoa during storage in vitro, The 7th International Congress on Animal Reproduction, München, vol. 2, p. 1211.

Cantacuzene, D., Guerreiro, C., *Optimization of the papain-catalyzed esterification of amino acids by alcohols and diols*, Tetrahedron, 45, 741-748 (1989).

Cardellicchio, C., Naso, F., Scilimati, A., *An efficient biocatalyzed kinetic resolution of methyl (Z)-3-arylsulphynilpropeonates*, Tetrahedron Lett., 35, 4635-4638 (1994)

Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W., 2001, The Fungi, Academic Press

Casselton, L.A., Olesnicky, 1998, Molecular genetics of mating recognition in basidomycete fungi, Microbiol.Molec.Biol.Rev., 62, p. 55-70.

Câmpeanu Gheorghe, Neamțu Gavril, Socaciu Carmen, *Biochimie vegetală*, Editura Didactică și Pedagogică, R.A., București (1993).

Chaabouni S.E., Mosrati R., Ellouz R. – "Preliminary assessment of *Penicillium occitanis cellulase:* A further useful system", Enzyme Microb. Technol., **16**, 538-542 (1994).

Chardon-Loriaux, I., Charpentier, M., Percheron, F., 1986, Isolation and characterization of a linear plasmid from *Streptomyces rimosus*, *FEMS Microbiol.Letts.*, 35, p. 151-155.

Chauviere, Gilles, Coconnier, Marie-Helene, Kerneis, Sophie, Darfeuille-Michaud, Arlette, Joly, B., Servin, A.L., 1992, Competitive exclusion of diarrheagenic Escherichia coli (ETEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells bz heat-killed Lactobacillus. *FEMS Microbiology Letters*, 91: 213-218.

Cheeseman, J.M., (1988), Mechanisms of salinity tolerance in plants, *Plant Physiol.*, **87**, pp. 547-550.

Chen, H. & Hoover, D.G., 2003, *Bacteriocins and their food applications*, Comrehensive reviews in food science and food safety, vol. 2, p. 82-91.

Chen, S.T., Chen, S.Y., Hsiao, S.C., Wang, K.T., Kinetic Resolution of N-Protected Amino Acids Esters in Organic Solvents Catalyzed by a Stable Industrial Alkaline Protease, *Biotechnol. Letters*, 13(11), 773-778 (1991).

Chen, S.T., Chen, S.Y., Kao, C.L., Wang, K.T., Improved yield by cryoeffect in kinetically controlled peptide synthesis catalyzed with Alcalase, *Biotechnol. Lett.*, 16(10), 1075-1080, (1994).

Chen, S.T., Chen, S.Y., Kao, C.L., Wang, K.T., Proline as a nucleophile in kinetically controlled peptide synthesis catalysed by alcalase in 2-methyl-2-propanol, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4, 443-448 (1994).

Chen, S.T., Chen, S.Y., Wang, K.T., Kinetically controlled peptide bond formation in anhydrous alcohol catalyzed by the industrial protease Alcalase, *J. Org. Chem.*, 57, 6960-6965 (1992).

Chen, S.T., Tsai, C.F., Wang, K.T., Resolution of N-Protected Amino Acid Derivatives in Supercritical Carbon Dioxide Catalyzed by „Alcalase", *Bioorg. Med. Chem. Letters.*, 4(4), 625-630 (1994).

Chen, S.T., Wang, K.T., Peptide Synthesis in Organic Solvents Catalyzed by an Industrial Alkaline Protease „Alcalase", *J. Chinese Chem.* Soc., 39, 683-691 (1992).

Chen, W., E. Wang, S. Wang, Z. Li, X. Chen, and Z. Li. 1995 Characteristics of Rhyzobium tianshanense sp. no., a moderately and slowly growing root nodule

bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, P.R. China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 153 – 159

Chenn P., Microorganisms in Agriculture. *Biological Siences Review*, 1999.

Chibata, I., în *Immobilized enzymes*, Ed. I. Chibata, John Wiley, New York, p. 1-73, 1978

Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., în *Biotechnology*, vol. 7a, VCH Weinheim, Ed. J.F. Kenedy, p. 653-684, 1987

Chira A., *Calitatea produselor agricole şi alimentare*, Editura Ceres, Bucureşti, 2001

Christie, P.J., Agrobacterium tumefaciens T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in Eubacteria. *Journal of Bacteriology*, **179, 10,** 3085-3094, 1997.

Ciofu Ruxandra (coordonator), *Tratat de Legumicultură*, Editura Ceres, Bucureşti, 2004.

Ciopa, G., Garger, S.J., Sverlw, G., Grill., L.K., 1990, Melanin production in *E.coli* from a cloned tyrosinase gene, *Bio/Technology*, 8, p. 634-638.

Cohen S.N., 1993, Bacterial plasmids: their extraordinary contribution to molecular genetics. *Gene* 135:67-76.

Collins, J. K., G. Thornton, G. O'Sullivan. 1998. Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.* 8:487-490.

Colvin J. Ross, *Biosinteza celulozei*, in "The Biochemistry of Plants", Academic Press, ed. P.K. Stumpf, E.E. Conn, vol. 3 (1980)

Conway, P. L. 1996. Selection criteria for probiotic microorganisms. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 5:10-14.

Cooper G.M., 2000, *The Cell - A Molecular Approach*. 2nd ed., Sinauer Associates, Inc., SUA.

Cormack, B.P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N.A.R., Falkow, S., Brown, A.J.P., (1997), Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*, *Microbiol.*, **143**, pp. 303-311. ilbag la EGFP

Cornea, C.P., 1998, *Elemente de inginerie genetică*, Editura ALL, Bucureşti.

Cornea, C.P., 2002, *Inginerie genetică. Principii de realizate, Aplicaţii şi aspecte etice*, Edit. Printech Bucureşti.

Cornea, C.P., Mateescu, R., Grebenişan, I., 2002, *Genetica microoganismelor*, Tipografia USAMV Bucureşti.

Cornea, C.P., Vătafu, I., Barbu, A., 1998, *Elemente de inginerie genetică*, Edit. ALL Educational.

Cotrău, M., 1978, *Toxicologie, principii generale*, Ed. Junimea, Iaşi.

Coughlan, M.P., Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview, *Bioresource Technology*, **39**, 107-115 (1992).

Coughland, M.P., *Microbial enzymes and biotechnology*, Fogarty W.M. & Kelly C. ed., Elsevier Applied Science, London (1992)

Covic, M., Ştefănescu, D., Sandovici, I., 2004, **Genetică medicală**, Editura Polirom.

Crabo, B.G., Larsen, R.E., Zimmerman, K.J., 1980, *Binding of seminal plasma proteins to boar spermatozoa*, The 9th International Congress on Animal Reproduction, Madrid, vol. 3, p. 269.

Crepin, M., 1987, *Expression des genes et genie genetique*, Edit. Hermann.

Cunningham-Rundles, S. şi Lin, D.H., Nutriţia şi sistemul imun al intestinului. *Nutrition* 14: 573-9, (1998).

D'arc Joanna A., Herzog Soares, 2003, Opportunistic infections by Toxoplasma gondii caused by exposure to coumarins originated from toxigenic fungi, *Rev. Bras. Farm.*, 84 (3), Brasil.

Dabulis, K., Klibanov, A.M., Dramatic enhancement of enzymatic activity in organic solvents by lyoprotectants, *Biotech. Bioeng.*, 41, 566-571 (1993).

Daggett, V., 1998, Structure-function aspects of prion proteins, Current Opinion in *Biotechnology* 9: 359-365.

Dale, B.L., Cellulose pretreatment: technology end techniques. *Annual reports on fermentation processes*, 8, 299-323 (1985);

Dale J.W., 1998, *Molecular Genetics of Bacteria*, 3rd Edition. Anonymous Chichester, UK: John Wiley & Sons.

Dandekar, A.M., LeRudulier, D., Smith, L.T., Jakowec, M.W., Gong, L.S., Valentine, R.C., (1983), *Rhizobium* as vector for genetic engineering of salinity and drought tolerant legumes. În *Plant Molecular Biology*, editată de Alan R. Liss, Ed. Academic Press, New York, pp. 277-289.

Davey, H.M., Kell B.D., (1996), Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses, *Microbiol. Rev.*, **60**, pp. 641-696.

Davidescu D. şi colab, 1992, *Protecţia chimică în agricultură VII*, Ed. Acad. Române.

Davidescu D, Velicica Davidescu, *Agricultura biologică, o variantă pentru exploataţiile mici şi mijlocii*, Editura Ceres, Bucureşti, 1994

Davis, B.G., Boyer, V., Biocatalysis and enzymes in organic synthesis, *Nat. Prod. Rep.*, 18, 618-640 (2001)

Dawson Karl A., *Some milestones in our understanding of yeast culture supplementation in ruminants and their implication in animal production systems.* Biotechnology in the Feed Industry, Alltech, Notthingham University Press, 473-486, (2000);

De La Riva, G.A., Gonzales-Cabrera, J., Vazquez-Padron, R., Ayra-Pardo, C., Agrobacterium tumefaciens: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*, **1., 3**, 1998.

De Roissart H., Luquet F. M., *Bacteries lactique*, vol. I, 406 – 423, (1994).

De Roissart H., Luquet F. M., *Bacteries lactique*, vol. II, (1994).

De Wulf, P., Brambilla, L. Vanoni, M., Porro, D., Alberghina, L., (2000), Real-time flow cytometry quantification and GFP-fluorescence generation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Microbiol. Methods*, 42, pp. 57-64.

Dejeu L., Petrescu C., Chira A., *Horticultură şi protecţia mediului*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1997

Del Solar G., Giraldo R., Ruiz-Echevarria M.J., Espinosa M., Diaz-Orejaz R., 1998, Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Molec Biol Rev* 62(2):434-464.

Dellapenna, D. *Plant metabolic engineering.* Plant Physiology, **125**, 160 – 163, 2001.

Dennis J., O'Kane R., Veinshilboum M., Thomas P., Moyer, 2003, Pharmacogenomics and reducing the frequency of adverse drug events, Pharmacogenomics, 2.

Doppelbauer F., Esterbauer H., Steiner W., Lafferty R.M., Steinmuller H., The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by *Trichoderma reesei*, *Appl. Microbiol. Technol.*, 26, 485-494 (1987)

Dragomir Neculai, *Curs, Tehnologia producerii de proteină vegetală direct din azotul atmosferic*, USAMV Timişoara 2004.

Drueckhammer, D.G., Barbas, C.F., Nozaki, K., Wong, C.H., Chemoenzymatic synthesis of chiral furan-derivatives – useful building-blocks for optically-active structures, *J. Org. Chem.*, 53, 1607-1611 (1988).

Dudley,W., 1990, *Genetic engineering – opposing viewpoints*, Greenhaven Press.

Duff S. J. B., Murray W.D., Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel and ethanol: a review, *Bioresource Technology*, 55, 1-33 (1996).

Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. C. O'Sullivan, F.

Shanahan, J. K. Collins. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:386S-392S.

Dyck M., K., Buhr M., M., 1994, Activitatea fosfolipazei A2 în sperma proaspătă şi congelată a vierilor, *Canad. J. of Anim. Sci.*, vol. 74, nr. 1, p. 59.

Eberling, J., Braun, P., Kowlczyk, D., Schultz, M., Kunz, H., Chemoselective removal of protecting groups from O-glycosyl amino-acid and peptide (methoxy-ethoxy)ethyl esters using lipases and papain, *J. Org. Chem.*, 61, 2638-2646 (1996)

Ellul, P., Rios, G., Atares, A., Roig, L.A., Serrano, R., Moreno, V., (2003), The expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HAL 1 gene increases salt tolerance in transgenic plants watermelon [*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsun. & Nakai.], *Theor. Appl. Genet.*, **107**(3), pp. 462-469.

Embley T.M., Hirt R.P., Williams D.M., 1994, Biodiversity at the molecular level: the domains, kingdoms and phyla of life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345(1311):21-33.

Engels, J.W., Lotzbeyer, M., în *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Ed. by Drauz, K., Waldmann, H.,VCH, Weinheim, p. 929-942, 1995

Espinosa E., Solanilla E., Gil L., Josa A., Falceta M., V., Cruz J., I., 1992, *The influence of temperature, osmolarity and dilution on the HOS test in bovine semen*, Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, Haga, vol. 2, p. 435.

Espinosa M., del Solar G., Rojo F., Alonso J.C., 1995, Plasmid rolling circle replication and its control. *FEMS Microbiol Lett* 130:111-120.

Esterbauer H., Steiner W., Labudova I., Hermann A., Hayn M., Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale, Bioresource Technology, **36**, 51-65 (1991)

Estrada, A., 2005, Advanced in feed products through probiotics, *Feed Notes*, vol. 1, issue 1.

Etienne, J., Clauser, E., 2001, *Biochimie genetique. Biologie moleculaire*, Edit. Masson.

F.A.O – *Bulletin Pedologique de la FAO* nr. 49 – Application des systemes fixateurs d'azot dans l'amelioration et l'amenagement des sols.

Faber, K., *Biotransformation in Organic Chemistry*, Ed. Springer-Verlag, 334-418, 2000

Facchini, P.J. Alcaloid biosynthesis inplants: biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. *AnnuRev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 29-66, 2001.

Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.H., Cellulose hydrolysis biotechnology monographs, 3 (1987).

Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.H., Evaluation of pretreatments for enzymatic conversion of agricultural residues, *Biotecnol. Bioeng.*, **11**, 247-252 (1981)

Fang J.M., Sun R.C., Tomkinson J., Isolation and characterization of hemicelluloses and celulose from rye straw by alkaline peroxide extraction, in *Cellulose*, Ed. Springer *Science*, 7, nr.1, 87-107 (2000).

Felsot, A.S. *„Pharm Farming": It/s not your father ,s agriculture.* Agrichemical and Environmental News, available at http://www.aenews.wsu.edu, July 2002.

Ferket, P., *Menţinerea sănătăţii intestinale într-o lume fără antibiotice*, Al 17-lea Turneu de Conferinţe Alltech pentru Europa, Orientul Mijlociu şi Africa, 2003, Ed. Coral Sanivet, Bucureşti, p. 53-76 (2003).

Fernandes, J. F. A., Halling, P. J., Operational Stability of High Initial Activity Protease Catalysts In Organic Solvents, *Biotechnol. Progress*, 18, 1455-1457 (2002).

Ferrari, M., Marcon, E., Menta, A., *Lotta Biologica, controllo biologica ed integrata nella pratica fitoiatrica*, Edizione Agricole, 1992.

Fillinger, S., Chaveroche, M-K., Van Dijck, P., De Vries, R., Ruijter, G., Thevelein, J., d'Enfert, C., (2001), Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans, Microbiology,* 147, pp. 1851-1862.

Fisher B., 1991, Pentachlorophenol: Toxicology and Environmental Fate, *Journal of pesticide reform*, Vol. 11, No. 1.

Fitzpatrick, P.A., Klibanov, A.M., How Can the Solvent Affect Enzyme Enantioselectivity? *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 3166-3171 (1991)

Flaschel, E., Renken, A., în *Biocatalysis in Organic Media*, Ed. J. Tramper, H. C. van der Plas, P. Linko, Elsevier, Amsterdam, p. 375-380, 1987

Flores, H.E., Vivanco, J.M., Loyola-Vargas, V.M. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends in Plant Science*, 4, 6, 220-226, 1999.

Flores, H.E., Weber, C., Puffett, J. *Underground metabolism: the biosintetic potential of roots, in Roots: The Hidden Half* (Waisel, Y. et al., eds), Marcel Dekker, 931-956, 1996.

Fox D.J., Gray P.P., Dunn N.W., Matsden W.L., "Comparison of alkali and steam (acid) pretreatment of lignocellulosic materials to increase enzymatic susceptibility evaluation under optimized pretreatment conditions." *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 44, 135-146 (1989).

Frankel,A.E., 1992, *Genetically engineered toxins*, Edit. Marcel Dekker Inc.

Franz Ch, Holzapfel Wh, Stiles Me, 1999, Enterococci At The Crossroads Of Food Safety? *Int. J. Food Microbiol.*, 47: 1-24

Franz G. & W. Blaschek – "Methods in Plant Biochemistry", P.M. Dey , J.B. Harborne ed., Academic Press, New York, (1993)

Fraser, H.B., Hirsh, A.E., Giaever, G., Kumm, J., Eisen, M.B., Noise minimization in eukaryotic gene expression, *Plos Biol.*, 2(6), pp. 1-6.

Fraser, *Reponse du trefle a Rhizobium trifolii et a un inoculum granule,* 1966.

Freifelder D., 1987, *Microbial Genetics.* Jones and Bartlett Publishers. Boston, USA.

Frost, G. M., Moss, D. A., în *Biotechnology*, vol. 7a, *Enzyme Technology*, Ed. John F. Kennedy, VCH, Weinheim, p. 156-170, 1987.

Fuji, M., Takagi, M., Imanaka, T., Aiba, S., Molecular cloning a thermostable neutral protease gene from Bacillus stearotermophilus in a vector plasmid and its expression in Bacillus stearotermophilus and Bacillus subtilis, *J. Bacteriol.*, 154, 831-835 (1983).

Gais, H. J., în *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Ed. K. Drautz, H. Waldmann, VCH, Weinheim, p. 196-200, 1995.

Garcia, M.J., Rios, G., Ali, R., Belles, J.M., Serrano, R., (1997), Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology,* 143, pp. 1125-1131.

Gartland, K.M.A., Gartland, J.S., 1994, *"In vivo" techniques of genetic manipulation, in Techniques for engineering genes*, Ed.K.M.A.Gartland, Buttterworth-Hheinemann Ldt., p. 5-36.

Gasch, A.P., (2003), The environmental stress response. În Topisc in Current Genetics, *Yeast Stress Response*, vol. 1, editată de Hohmann, S., Mager, P.W.H., Ed. Springer-Verlag, Berlin, pp. 11-70.

Gavrilă L., 2003, *Genomica – Un tratat despre genom, de la virusuri la om*, vol. I și vol. II, Editura Enciclopedică, București.

Gaxiola, R., De Larrinoa, I.F., Villalba, J.M., Serrano, R., (1992), A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast, *EMBO J.*, 11(9), pp. 3157-3164.

Gellissen, G., Janowicy, Y.A., Melber, K., Hollenberg, C.P., 1992, High/level expression of foreign genes in *Hansenula polzmorpha*, Biotechnol.Adv., 10, 179-189.

Gelvin, S.B. *Agrobacterium – mediated plant transformation: the biology behind the „gene jockeying" tool.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, **67.1,** 16-37, 2003.

Ghazi S., Rooke J.A., Galbraith H., *Improvement of the nutritive value of soybean meal by protease and alpha-galactosidase treatment in broiler cockerels and broiler chicks*, British Poultry Science 44 (3): 410-418 (2003).

Gibson, G.R., 1995, *Dietary modulation of human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics*, Journal Nutriton, no. 125, p. 1401-1412.

Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., Carter, A. *Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals.* Nature Biotechnology , **18**, 1151-1155, 2000.

Gilson E., Bachellier S., Perrin S., Perrin D., Grimont P.A.D., Grimont F., Hofnung M., 1990, Palindromic unit highly repetitive DNA sequences exhibit species specificity within *Enterobateriaceae. Researches in Microbiology* 141:1103-1116.

Glynne-Jones A., October 2001, Pyrethrum, a unique biopesticide, Journal Pesticide Outlook, The Royal Society of Chemistry (on line).

Gonzales-Hernandez, J.C., Jimenez-Estrada, M., Pena, A., (2005), Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress, *Extremophiles*, **9**(1), pp. 7-16.

Gordon,G.S., Wright,A., 2000, DNA segregation in bacteria, *Annu.Rev.Microbiol.*, 54, p. 681-708.

Gould, J.M., "Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification", *Biotechnol. Bioengng.*, 26, 45-52 (1984)

Gould, J.M., "Studies on the mechanism of alkline peroxide delignification of agricultural residues" *Biotechnol. Bioengng.*, 27, 225-231 (1985).

Graham S. J., Clarke A. R., 2000, Mammalian prion proteins, Current Opinion in Structural Biology, 10: 69-74.

Gratz S., Mykkanen, H., Ouwehand, A.C., Juvonen R., Salminen S. & El-Nezami, H., 2004, Intestinal mucus alerts the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B_1 in vitro, *Applied and Environmental Microbiology*, vol.70, no.10, p. 6306-6308.

Griffith, A.J.F., Wessler,S.R., Lewontin,R.C., Gelbart,W.M., Suzuki, D.T., Miller, J.M., 2004, *An introduction to genetic analysis*, W.H. Freeman Publisher.

Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M., 1999, Introduction to Genetic Analysis. 7th ed., W. H. Freeman & Co., New York.

Gruchalla Rebecca S., Munir Pirmohamed, 2006, Antibiotic Allergy, *The New England Journal of Medicine*, 354;6.

Guillot, J.F., Ruckebusch, Y.,1994, *Microflore digestive des animaux*, Bacteries lactiques – Aspects fondamentaux et technologiques, Ed. Lorica, vol.2.

Hanning, G., Makrides,S.C., 1998, Strategies for optimising heterologous protein expression in *E.coli*, *Trends Biotechnol.*, 16, 54-60.

Hanson, A.D., (1998), Metabolic Engineering of crops for drought and salt tolerance, *NRI Grant Programme.*

Hardy K.G., 1988, *Plasmids: A Practical Approach.* IRL Pres. Oxford, UK.

Hardy, K., 1981, Bacterial plasmids, in *Aspects of microbiology*, Edit. Nelson.

Hardy, K.G., 1987, Purification of bacterial plasmids, in *Plasmids: a practical approach*, IRL Press, p. 1-6.

Haro, R., Banuelos, M.A., Quintero, F.J., Rubio, F., Rodriguez-Navarro, A., (1993), Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants, *Physiol. Plant*, **89**, pp. 868-874.

Harrison, R., A., P., Mairet B., Miller N., G., A., 1992, Bicarbonate / CO_2 mediated Ca^{2+} influx in boar spermatozoa, Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, Haga, vol. 2, p. 475.

Harry A. Kuiper, Gijs A. Kleter, Hub P. J. M. Noteborn, Esther J. Kok, 2001, Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods, *The plant Journal*, 27 (6), 503 – 528.

Harry, M., 2001, *Genetique moleculaire et evolutive*, Edit. Maloine.

Hartl, D.L., Freifelder, D., Snyder, L.A., 1988, Basic genetics, Jones and Bartlett Publishers.

Havenaar, R., Spanhaak, S., 1994, *Probiotics from an immunological point of view*, Current Opinion in Biotechnology, no. 5, p. 320-325.

Hayn, M., Steiner, W., Klinger, R., Steinmuller, H., Sinner, M., Esterbauer, H., Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics, in Bioconversion of Forest and Agricultural Plant residues, *Biotechnology in Agriculture Series*, ed. J.N. Saddler, CAB International, Wallingford, UK, 9, 33-72 (1993).

Herlea V., 1998, *Microbiologie generală*, Ed. Univ., Bucureşti.

Hinnebusch H., Barbour A.G., 1992, Linear- and circular-plasmid copy numbers in Borrelia burgdorferi. *J.Bact.* 174(16):5251-5257.

Hinnebusch J., Tilly K., 1993, Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Molecular Microbiology* 10(5):917-922.

Hiraga S., 1992, Chromosome and plasmid partition in *E.coli. Annu Rev Biochem* 61: 283-306.

Hodges, L. D., Cuperus, J., Ream, W. Agrobacterium rhizogenes GALLS protein substitutes for Agrobacterium tumefaciens single-stranded DNA-binding protein VirE2. *Journal of bacteriology*, 3065-3077, 2004.

Hohmann, S., (1997), Shaping up: the response of yeast to osmotic stress. În *Yeast Stress Response*, editată de Hohmann, S., Mager, W.H., Austin, T.X., Ed. R.G. Landes, Londra, pp. 101-145.

Hohmann, S., (2002), Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts, *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.*, **66**(2), pp. 300-372.

Hohmann, S., Mager, W.M. (2003), Introduction. În *Topisc in Current Genetics, Yeast Stress Response*, vol. 1, editată de Hohmann, S., Mager, P.W.H., Ed. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-9.

Hohmann, S., Tamas, M.J., (2003), The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. În *Topisc in Current Genetics, Yeast Stress Response*, vol. 1, editată de Hohmann, S., Mager, P.W.H., Ed. Springer-Verlag, Berlin, pp. 121-200.

Holmberg, N., Bulow, L., (1998), Improving stress tolerance in plants by gene transfer, *Trends in Plant Sci.*, 3(2), pp. 61-66.

Holmstrom, K.O., Mantyla, E., Welin, B., Mandal, A., Palva, E.T., Drought tolerance in tabacco (1996), *Nature*, 379, pp. 683-684.

Holmstrom, K.O., Somersalo, S., Mandal, A., Palva, T.E., Welin, B., (2000), Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tabacco producing glycine betaine, *J. Exp. Bot.*, 51(343), pp. 177-185.

Holmstrom, K.O., Welin, B., Mandal, A., Kristiansdottir, I., Teeri, T.H., Lamark, T., Strom, A.R., Palva, E.T., (1994), Production of the *Escherichia coli* betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine, in transgenic plants, *Plant J.*, 6(5), pp. 749-758.

Holton, T.A., Cornish, E.C. *Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis.* The Plant Cell, 7,1071- 1083, 1995.

Honjo, M., Manabe, K., Shimada, H., Mita, I., Nakayama, A., Furutani, Y., *Cloning and expression of the gene for neutral protease of Bacillus amyloliquefaciens in Bacillus subtilis,* J. Biotechnol., 1, 265-271 (1984)

Hoople, D.W.T., *Biotechnology and Biotransformations I,* vol. 8a, 243-276, 1998.

Hopwood, D.A., 1981, Genetic studies with bacterial protoplasts, *Ann.Rev. Microbiol.*, 35, p. 237-272.

Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., Schrempf, H., 1985, *Genetic manipulation of Streptomyces*: a laboratory manual, Norwich, John Innes Foundation.

Hopwood, D.A., Kieser, T., Lydiate, D.J., Bibb, M.J., 1986, *Streptomyces* plasmids: their biology and use as cloning vectors, in *The Bacteria*, vol.9., Ed. S.W. Queener şi L.E. Day, Academic Press, p. 159-229.

Huh, G.-H., Damsz, B., Matsumoto, T.K., Reddy, M.P., Rus, A.M., Ibeas, J.I., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., (2002), Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants, *Plant J.*, 29(5), pp. 649-659.

Hyrayama, K., 1999, Ex - germfree mice harboring intestinal microbiota dervide from other animal species as an experimental model for ecology and metabolism of intestinal bacteria, *Ex. Anim.*, no. 48 (4), p. 219-227.

Iborra, J.L., Obon, J.M., Manjon, A., Canovas, M., Water concentration and activity effects on aminoacylase in aqueous/organic one-liquid-phase systems, *Biocatalysis*, 7, 37-48 (1992).

Ikeda, M., Nakanishi, K., Kino, K., Katsumata, R., 1994, Fermentative production of tryptophan by a stable recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* with a modified serine-biosynthetic pathway, *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 58, p. 674-678.

Ioanid N. I., 1965, *Toxicologie*, Ed. Didact. şi Pedag., Bucureşti.

Israel-Roming F., Câmpeanu G., Zamfir E., Improving the susceptibility of lignocellulosic materials to enzymatic hydrolysis by alkalino-peroxidic pretreatment, *Roumanian Biotechnological Letters*, **10 (6)**, 2435-2441 (2005).

Itakura, K., Rossi, J.J., Wallace, R.B., 1984, Synthesis and use of synthetic oligonucleotides, *Ann.Rev.Biochem.*, 53, p. 323-336.

Itoh, K., Sekizaki, H., Toyota, E., Fujiwara, N., Tanizawa, K., Application of inverse substrates to trypsin-catalyzed peptide synthesis, *Bioorg. Chem.*, 24, 59-68 (1996).

Jakubke, H.D., Eichhorn, U., Hansler, M., Ullmann, D., Non-conventional enzyme catalysis: application of proteases and zymogens in biotransformations, *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 377, 455-64 (1996).

Jeyendran R., S., Hunter A., C., 1980, *Properties of the bovine seminal plasma-egg yolk protein interaction complex formed during cryopreservation*, The 9th International Congress on Animal Reproduction, Madrid, vol. 3, p. 382.

Jones J., August 2001, A new biopesticide which activates natural plant defence growth systems, *Journal Pesticide Outlook*, The Royal Society of Chemistry (on line).

Jones, J., *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford Science Publications, Oxford, 1992.

Julien, R., Cenatiempo,Y., 1993, *Biotechnologies d'aujourd'hui*, Presse de l'Universite de Limoges.

Jurcoane Ş., Săsărman E., Roşu, A., Banu A., Lupescu I., Berehoiu Tamba E., Rădoi F., 2004, *Tratat de biotehnologie*, Editura Tehnică, vol.1., Editura Tehnică, 2004.

Jurcoane Ştefana, *Biotehnologii – Fundamente-Bioreactoare-Enzime*, Editura Tehnică, Bucureşti, (2000).

Kamphuis, J., Meijer, E.M., Boesten, W.H.J., Sonke, T., van den Tweel, W.J.J., Schoemaker, H.E., *New Developments in the Synthesis of Natural and Unnatural Amino Acids*, Annal. New York Acad. Science, 672, pp. 510-527 (1992).

Kamphuis, J., van den Teweel, W.J.J, în *Enzyme catalysys in Organic Synthesis, A Comprehensive Handbook*, Ed. by K. Drauz, H. Waldmann, WILEY-VCH Weinheim, p. 376-393, 1995.

Kann M., L., Hollonde E., 1972, *Ultrastructural and cytochemical modifications of the cell coat of bull spermatozoon before and after freezing*, Proceedings of the 7th International Congress on Animal Reproduction, München, vol.2, p. 1325.

Kawakami, K., Matsui, Y., Ono, T., Ijima, H., Enhancement of protease activity in transesterification of glycidol with n-butyrate by entrapment into alkyl-substituted silicates and pretreatment with a substrate, *Biocat. Biotransf.*, 21(1), 49-52, (2003).

Kawashiro, K., Ishizaki, H., Sugiyama, S., Hayashi, H., Esterification of N-Benzzyloxicarbonyldipeptides in Ethanol-Water with Immobilized Papain, *Biotecnol. Bioeng.*, 42, 309-314 (1993).

Kayingo, G., Kilian, S.G., Prior, B.A., (2001), Conservation and release of osmolytes by yeasts during hypo-osmotic stress, *Arch. Microbiol.*, 177, pp. 29-35.

Kieser, T., Hopwood, D.A., Wright, H.M., Thompson, C.J., 1982, pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors, *Mol.Gen.Genet.*, 185, p. 223-238.

Kinashi, H., 1989, Giant linear plasmids in various methylenomycin-producing strains of *Streptomyces* species, in *Genetics and Molecular Biology of Industrial Micro-organisms*, Ed. C.L. Hershberger, S.W. Queener, G. Hegeman, ASM, p. 141-146.

Kishinevsky, B., Strijdom, B.W., Otto, C.J., Lochner, H. H. and Kriel, M. M. 1987, Response to inoculation of groundnuts grown under irrigation in soil containing indigenous rhizobia. *South African Journal of Plant and Soil* 4, 75-78.

Kitaguchi, H., Fitzpatrick, P.A., Huber, J.E., Klibanov, A.M., *Enzymatic resolution of racemic amines-crucial role of solvent*, J. Am. Chem. Soc., 111, 3094-3095 (1989)

Klibanov, A.M., Enzyme memory. What is remembered and why? *Nature*, 374, 596 (1995)

Kloepper, J. W., and C. J. Beauchamp. 1992. A review of issues related to measuring colonisation of plant roots by bacteria. *Ca. J. Microbiol.* 38: 1212-1232

Kluepfel, D. A. 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. Annu. Rev. *Phytopathol.* 31: 441-472.

Klyosov A.A., Trends in biochemistryand enzymology of cellulose degradation, *Biochemistry*, 29, 10577-10585 (1990).

Kobayashi, T., Murai, A., Okada, T., Okumura, J., Influence of dietary phosphorus level on growth performance in chicks given corn-soybean diet supplemented with amylase and acid protease, *Animal Science Journal* 73 (3) : 215-220 (2002).

Kost, T.A., Condreaz, J.P., 1999, Recombinant baculoviruses as expressionvectors for insects and mammalian cells, *Curr.Opin.Biotechnol.*, 10, 428/433.

Krallish, I., Jeppsson, H., Rapoport, A., Hahn-Hagerdal, B., (1997), Effect of xylitol and trehalose on dry resistance of yeasts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, pp. 447-451.

Kramer,R., 1996, Genetic and physiological approaches for the production of amino acids, *J.Biotechnol.*, 45,1-21.

Kreft, J., Hugues, C., 1982, Cloning vectors derived from plasmids and phage of *Bacillus*, *Current Topics Microbiol. Immunol.*, 96, p. 1-18.

Kritas, S.K., Morrison, R.B., 2005, Evaluation of probiotics as a substitute for antibiotics in a large pig nursery, *The Veterinary Record*, no. 156, p. 447-448.

Kubicek, C.P., Harman, G.E., 1998, *Trichoderma and Gliocladium*, Taylor and Francis Eds.

Kutchan, T.M. *Alkaloid biosinthesis-the basis for metabolic engineering of medicinal plants.* The plant Cell, 7,1059-1070, 1995.

Lazăr Veronica, Balotescu Carmen, Diana Smarandache, Vassu Tatiana, Săsărman Elena, Petrache Lia Mara, Orășanu Mariana, Cernat Ramona, 2004, *In vitro* study of the interference of some Enterococcus strains with the adhesion of human and poultry enteropathogens to Hela cells. *Roumanian Biotechnological Letters*, **9:** 1675 – 1681.

Lazăr Veronica, Balotescu Mariana C., Vassu Tatiana, Barbu Vasilica, Smarandache Diana, Săsărman Elena, Israil Anca, Bulai Doina, Alexandru Ionela, Cernat Ramona, 2005, Experimental study on rats of the probiotic effect of some lactic acid bacteria previously selected for their *in vitro* capacity to interfere with Salmonella enteritidis infection. *Roumanian Biotechnological Letters* **10:** 2123 - 2133.

Lazăr Veronica, Bezirtzoglou Eugenia, Balotescu Carmen, Cernat Ramona, Ilina Lucia, Bulai Doina, Vadineanu Elena, Tache Elena, 2004, Study of adhesive and invasion capacity of some opportunistic enterobacterial strains and interaction with probiotics. *Roumanian Biotechnological Letters*, **9:** 1705 – 1711.

Lee C. R., Goldstein J., A., 2002, Cytochrome P 450 2 Cp polymorphism: a comprehensive rewiev of the in vitro and human data. *Pharmacogenomics*, 12.

Lemacke, K., Prinsen, E., Onckelen, van H., Schmulling, T. *The ORF8 gene product of Agrobacterium rhizogenes TL-DNA has tryptophan 2-monooxygenase activity.* MPMI, American Phytopatological Society, **13,7,** 787-790, 2000.

Lessard, P.A., Kulaveerasingam, H., York, G.M., Strong, A., Sinskey, A.J. Manipulating gene expresion for the metabolic engineering of plants. *Metabolic Engineering*, 4, 67 – 79, 2002.

Lewin B., 1997, *Genes.* 6th ed., Oxford University Press, New York, USA.

Lima de Lima Patrícia Danielle, Elizabeth Sumi Yamada, Edmar Tavares da Costa, Dec. 2005, Genotoxic effects of rotenone on cultured lymphocytes, On line *Journal Genetic and Molecular Research.*

Lin Chunjian, Bolse K. K., Brent B. E., Fung D. Y. C., Epiphytic lactic acid bacteria succesion during the pre-ensiling periods of alfalfa and maize, *Journal of Applied Bacteriology*, 375-387, (1992).

Ljunger, G., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., *Reactions catalyzed by PEG-modified α-chymotrypsin în organic solvent. Influence of water content and degree of modification*, Biocatalysis, vol. 7 , 279-288 (1993).

Lodge J., R., Graves C., N., Salisbury G., W., Hart R., G., 1972, *Aging phenomena in spermatozoa* (VI). Chemical determinations of DNA of fresh and aged bull spermatozoa, The 7th International Congress on Animal Reproduction, München, vol. 1, p. 474.

Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E., 2000, Molecular Cell Biology. 4th ed., W. H. Freeman & Co. Publishing, New York.

Loret J, *and et al.,* Ionic stress and osmotic pressure induce diferent alternations in the LPS of Rhizomelite strain. *Applied and Environmetal Microbiology 61*, 1995.

Loyter, A., Rosenbluh, J., Zakai, N., LI, J., Kozlovsky, S.O., Tzfira, T., Citovski, V. The plant VirE2 interacting protein. A molecular link between the Agrobacterium T-complex and the host cell cromatin? *Plant Physiology*, **138**, 1318-1321, 2005.

Lura Maria Cristina, Marta Beatriz Fuentes, 2001, Actividad de metabolitos de Penicillium citrinum sobre ratones Mus musculus, *Rev Iberoam Micol*, 18.

Lynd L.R., Weimer P.J., Willen van Zyl H., Pretorius I.S., Microbial cellulose utilization. Fundamentals and biotechnologies, *Mycrobiology and molecular biology review*, 66, nr.3, 506-577 (2002).

Lyons, P., The globalization of the animal feed industry: are we marketing animal feed or human food? *Biotechnology in the Feed industry*, Proceedings of Alltech's 16th Annual Symposium, University Press, Nottingham, 1-19 (2000)

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., (2000), Microbial growth. În *Brock Biology of Microorganisms*, Ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, pp. 135-163.

Madigan, M.T., Martinenko, J.M., Parker, J., 1997, *Biology of microoganisms*, Eighth editions, Prentice Hall Internat.Inc.

Mager, W.H., Maurer, K., Piper, P.W., (1998), Identifying stress genes. În *Methods in Microbiology, Yeast Gene Analysis* vol. 26, editată de Brown A.J.P., Tuite M.F., Ed. Academic Press, Londra, pp. 337-350.

Mager, W.H., Siderius, M., (2002), Novel insights into the osmotic stress response of yeast, *FEMS Yeast Res.*, 2, pp. 251-257.

Mandels M., *Cellulases.* Annual Reports on Fermentation Processes, 5, 35-78, (1981).

Manen D., Caro L., 1991, The replication of plasmid pSC101. *Molecular Microbiology* 5(2): 233-237.

Manjon, A., Obon, J.M., Canovas, M., Iborra, J.L., *Corelations between enzyme activity, water activity, and log P in one-liquid-phase systems*, Biocatalysis in Non-Conventional Media, Ed. J. Tramper, 121-128, 1992.

Marc A., Riedi M., D., Adrian M., Cassilas M., D., 2003, Adverse drug reactions: Types and Treatment Options, *American Family Physician*, vol. 68, number 9, nov., pag.1782.

Marchessault, R. H., Malhatra, S. L., Jones, A. Y. & Perovic, A., *Wood and Agricultural Residues. Research on Use for Feed, Fuel and Chemicals*, Soltes E. J. ed., Academic Press, New York, (1983).

Margulis L., 1992, Biodiversity: molecular biological domains, symbiosis and kingdom origins. *Biosystems* 27(1): 39-51.

Marinescu, Al., *Chimizarea în nutriția animalelor*, Ed. Ceres, București, p. 133-136, 1980.

Marks, T., Sharp, R., 2000. Bacteriophages and biotechnology: a review, *J.Chemical Technol.Biotechnol.*, 75, p. 6-17.

Martin, M.A., *Role of Lactic Acid Fermentation in Bioconversion of Wastes*, 219, 245, (1998).

Martin, J.F., Liras, P., 1989, Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites, *Ann. Rev. Microbiol.*, 43, p.173-206.

Mateescu, R., Cornea, C.P., Grebenișan, I., Câmpeanu, G., 2002, Aplicații biotehnologice ale bacteriilor din genurile *Streptomyces* și *Baciilus*, în *Progrese în Biotehnologie*, vol. I., p. 123-162, Edit. I.F. Dumitru și G. Câmpeanu, Editura Ars Docendi.

Matilla-Sandholm T., Blum S., Collins J.K., et al. 1999. Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Sci Technol.*, 10:393-399.

Mazdiyasni, H., Konopacki, D.B., Dickman, D.A., Zidowsky, T.M., Enzyme-catalyzed synthesis of optically pure β-sulfonamidopropionic acids-useful starting materials for p-3 site modified renin inhibitors, *Tetrahedron Lett.*, 34, 435-438 (1993)

Medina-Bolivar, F.B., Flores, H.E., Selection for hyoscyamine and cinnamoyl putrescine overproduction in cell and root cultures of Hyoscyamus muticus. *Plant Physiol.* 108, 1553- 1560, 1995.

Middlebrook J., Franz D., 1995, Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare-Botulinum toxins, 33, Acad. Press, New York.

Miller, J.M Wood, Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Microbiology,* 1996.

Mitin, Y.V., Braun, K., Kuhl, P., Papin Catalyzed Synthesis of Glyceril Esters of N-protected Amino Acids and peptides for the Use in Trypsin catalyzed peptide Synthesis, *Biotecnol. Bioeng.*, 54, 287-291 (1997).

Moldoveanu, D., Vătafu, I., Avram, D., Vintilă, D., Cornea, C.P., Muntean, V., 1988, *Implicaţii biotehnologice ale protoplaştilor bacterieni, în Inginerie genetică:* note de curs, Coord. I. Anghel, Edit. Univ., p. 179-197.

Moller-Jensen J., Gerdes K.J.R., 2000, Plasmid and chromosome segregation in prokaryotes. *Trends in Microbiology* 8(7):313-320.

Morelli, L., 2000, *In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal, *Curr. Issues Intestinal Microbiology*, no. 1(2), P.59-67.

Mulet, J. M., Alemany, B., Ros, R., Calvete, J.J., Serrano, R., (2004), Expression of a plant serine O-acetyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* confers osmotic tolerance and creates an alternative pathway for cysteine biosynthesis, *Yeast,* **21**, pp. 303-312.

Nagayasu, T., Miyanaga, M., Tanaka, T., Sakiyama, T., Nakanishi, K., Synthesis of an aspartame precursor with an immobilized thermolysin in tert-amyl alcohol, *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 1118-1123 (1994).

Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R.A. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene in petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, **2**, 279-289, 1990.

Neamţu G., 1997, *Biochimie alimentară*, Ed. Ceres, Bucureşti.

Nenitescu C., D., 1974, *Chimie organică*, vol. II, Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti.

Nester E.W., Evans Roberts C., Nester M., 1995, *Microbiology*, A Human Perspective, WCB Publishers, SUA.

Nunez, R., (2001), Overview of flow cytometry instruments. În *Flow cytometry for Research Scientists: Principles and Applications*, Ed. Horizon Press, pp. 5-16.

Ogura, R., Matsuo, N., Wako, N., Tanaka, T., Ono, S., Hiratsuka, K. Multi-color luciferases as reporters for monitoring transient gene expression in higher plants. *Plant Biotechnology*, **22(2)**, 151-155, 2005.

Oren, A., (1999), Bioenergetic aspects of halophilism, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**(2), pp. 334-348.

Orr, J.D., Edwards, R., Dixon, R.A., (1993), Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Plant Physiol.*, **101**, pp. 847-856.

Outtrup, H., Boyce, C.O.L., în *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Ed. W.M. Fogarty, C.T. Kally, 2nd Ed, Elsevier, London, p. 227-255, 1990.

Pană, C.O., *Biotehnologii în nutriţia şi alimentaţia animalelor*, Ed. Coral Sanivet, Bucureşti, p. 89-114, 2000.

Parks C.W., Grimes J.L., Ferket P.R., Fairchild A.S., The case for mannanogligosaccharides in poultry diets. An alternative to growth promotant antibiotics? *Biotechnology in the Feed Industry*, Alltech, Notthingham University Press, 45-60, (2000).

Pascual, M., Hugas, M., Badiola, J.I., Manfort, J.M., Garriga, M., 1999, *Lactobacillus salivarius* CTC2197 Prevents *Salmonella enteritidis Colonization in Chickens, Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, no.11, p. 4981-4986.

Paster N., Barkai-Golan R., Padova R., 1985, Effect of gamma radiation on ochratoxinproduction by the fungus Aspergillus ochraceus, *J. Sci. Food. Agric.*, 36: 445-449.

Patel, M.M., Bhatt, R. M., "Optimization of the alkaline peroxide pretreatment for the delignification of rice straw and its applications", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 53, 253-263, (1993).

Peppler, H.J., Reed, G., în *Biotechnology*, vol. 7a, *Enzyme Technology*, Ed. John F. Kennedy, VCH, Weinheim, p. 546-603, 1987.

Perdigon, G., Fuller, R., Raya, R., 2001, Lactic acid bacteria and their effect on the immune system, *Curr. Issues in Intest. Microbiol.*, 2 (1), p. 27-42.

Persson I., Tjerneld F., Hahn-Hagerdal B., Fungal cellulolytic enzyme production: A review, *Process Biochemistry*, **26**, 65-74 (1991).

Peter, F., *Biotransformări enzimatice*, Ed. Politehnica, 95-114, 2005.

Peterson, D.S., Rohr, T., Svec, F., Frechet, J.M.J., High-throughput peptide mass mapping using a microdevice containing trypsin immobilized on a porous polymer monolith coupled to MALDI TOF and ESI TOF mass spectrometers, *J. Proteome Research*, 1 (6), 563-568 (2002).

Pettigrew J. E., *Bio-Mos effects on pig performance: a review*, Biotechnology in the Feed Industry, Alltech, Notthingham University Press, 31-44, (2000).

Pettijohn D.E., 1988, Histone-like proteins and bacterial chromosome structure. *Journal of Biological Chemistry* 263(26):12793-12796.

Pfeifer, C.C., Optical isomerism and pharmacological action, generalization, *Science*, 124, 29-31 (1956).

Philips, J., Herskowitz, I., (1997), Osmotic balances regulates cell fusion during mating in *Saccharomyces cerevisiae, J. Cell Biol.*, **138**(5), pp. 961-974.

Phythian, S., in *Biotechnology, Biotransformation I*, vol. 8a, Wiley-VCH Weinheim, Ed. D.R. Kelly, p. 193-243, 1998.

Pierce, J. L., *Aplicaţii ale enzimelor pentru cereale şi şroturi oleaginoase*, Ciclul de conferinţe Alltech 2002 pentru Europa, Orientul Mijlociu şi Africa, Ed. Coral Sanivet, Bucureşti, p. 50-65 (2002).

Plaxton, W.C., Principles of metabolic control. In: *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, Ed. By K.B. Storey, John Wiley & Sons, Inc., 1-23, 2004.

Poldermans, B., Enzymes în *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Ed. V, Vol. A 9, Ed. W. Gorhartz, Y.S. Yamamoto, J. F. Rounsaville, G. Schutz, VCH, Weinheim, p. 409-415, 1987.

Popa O., Salajan G., Sara A., *Nutreţurile şi nutriţia raţională a animalelor de fermă*, Editura Ceres, (1991).

Popa, L., Repanovici, R., 1982, *Tehnologia ADN recombinant (inginerie genetică)*, Edit. Ştiinţifică şi Enciclopedică.

Potter, H., 1991, Application of electroporation in recombinant DNA technology, *Meth. Enzym.*, 204, p. 461-483.

Pourquie J., Vandecasteele J.P., Conversion de la biomasse lignocellulosique par hydrolyse enzimatique et fermentation. Rene Scriban, *Biotechnologie*, 4e edition. (1993).

Powell, S.J., (1995), Protocol optimization and reaction specificity. În *PCR - Essential Data*, editată de Newton, C.R., Ed. John Wiley & Sons şi BIOS Scientific Publishers Limited, Chichester, pp. 72-85.

Preda, G., Peter, F., Chiriac, A., Csunderlick, C., *Subtilizine în solvenţi organici*, Seria Monigrafii de Chimie, vol. 47, Ed. A. Chiriac, Editura Universităţii de Vest, Timişoara, 2000.

Preda, G., Peter, F., Csunderlik, C., Chiriac, A., *Sinteze de α – aminoacizi optic activi prin metode chimice şi biochimice*, Seria Monigrafii de Chimie, Nr. 29, Tipografia Universităţii de Vest, Timişoara, 2000.

Prendergast, F.G., (1999), Biophysics of the green fluorescent protein. În *Methods in Cell Biology - Green Fluorescent Proteins*, vol. 58, editată de Sullivan, K.F., Kay, S.A., Ed. Academic Press, Londra, pp. 1-15.

Prenosil, J.E., Kut, O.M., Dunn, I.J., Heinzle, E., Immobilized Biocatalysts în *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Ed. V, Vol. A 14, Ed. L. Kandy, J. F. Rounsaville, G. Schutz, VCH, Weinheim, p. 1-48, 1987.

Prescott L.M., Harlez J.P., Klein D.A., 1996, *Microbiology*. Third Edition, WCB Publishers, SUA.

Primrose, S.B., Twyman, R.M., Old, R.W., (2001), Cloning in *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. În *Principles of the Gene Manipulation*, ediția a VI-a, Ed. Blackwell Science, Londra, pp. 161-173.

Quillien Jean-Francois, 2002, *Mycotoxins*, INRA, France.

Raicu P., Stoian V., 1991, *Genetica dezvoltării la eucariote*, Editura Academiei Române.

Raicu, P., Badea, E.M., Nicolae, I., (1997), Crearea de plante transgenice care exprimă gene de interes agronomic și industrial. În *Genetica - Genetică moleculară și inginerie genetică*, vol. 2, Ed. USAMV București, pp. 224-238.

Raser, J.M., O'Shea, E.K., (2004), Control of stochasticity in eukaryotic gene expression, *Science*, **304**, pp. 1811-1814.

Rasor, J.P., Voss, E., *Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry*, Appl. Catal. A: General, 221, 145-158 (2001).

Rastall, R. A., 2004, *Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance*, WALTHAM International Science Symposium: Nature, Nurture and the Case for Nutrition – American Society for Nutritional Science.

Răuță C., Cârstea S., Tuhai A., *Elemente fundamentale ale strategiei dezvoltării agriculturii durabile*. București, 1998.

Reece, R.J., 2004, *Analysis of genes and genomes*, John Wiley & Sons Ltd.

Reese, E,T., Siu R.G.H., Levinson H.S., Biological degradation of soluble cellulose derivates and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis, *Journal of Bacteriology*, **59**, 485-497 (1950).

Reid, G., 1999. *Testing the efficacy of probiotics*. Pages 129-140 *in* Probiotics: a critical review. G. W. Tannock, ed. Horizon Scientific Press, Wynmondham, United *Kingdom.*

Reid, G., 1999, The scientific basis for probiotics strains of Lactobacillus, *Applied and Environmental Microbiology*, vol.65, no.9, p. 3763-3766.

Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T., McCormick, J.K., 2003, Potential uses of probiotics in clinical practice, *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 16, p. 658-672.

Rep, M., Albertyn, J., Thevelein, J.M., Prior, B.A., Hohmann, S., (1999), Different signalling pathways contribute to the control of *GPD 1* gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae, Microbiology*, **145**, pp. 715-727.

Reslow, M., Adelcreutz, P., Mattiasson, B., On the importance of the support material for bioorganic synthesis, *Eur. J. Biochem.*, 172, 573-578 (1988).

Rhodes, M.J.C., Robins, R.J., Hamil, J.D., Parr, A.J., Hilton, M.G., Walton, N.J. *Properties of transformed root cultures.* In: Secondary Products from Plant Tissue Culture, Ed. by B.V. Carlwood & M.J.C. Rhodes, Oxford University Press, England, 201 – 225, 1990.

Riva, S., Chopineau, J., Kieboom, A.P.G., Klibanov, A.M., Protease-catalyzed regioselelctive esterification of sugars and related-compounds in anhydrous dimethylformamide, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 584-589 (1988).

Riva, G.A., Gonzales-Cabrera, J., Padron, R., 1998, Agrobacterium tumefaciens: a natural tool for plant transformation, *Electronic Journal of Biotechnology.*

Roberts, S. M., Turner, N. J., Willets, A. J., Turner, M. K., *Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Micro – Organisms*, Cambridge University Press, Cambridge, p. 140-180, 1995.

Roberts, S.M., *Preparative biotransformations*, J. Chem. Soc., Perkin Trans 1, 1-21 (1999).

Romero, C., Belles, J.M., Vaya, J.L., Serrano, R., Culianez-Macia, F.A., (1997), Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance, *Planta*, **201**, pp. 293-297.

Roşu, A., Elemente de inginerie genetica vegetala. Plante transgenice. In: *Elemente de biotehnologii vegetale. Aplicaţii în ameliorare*. Editura Ametist, Bucureşti, 71 – 88, 1999.

Ruis, H., (1997), Yeast stress response: achievements, goals and a look beyong yeast. În *Yeast Stress Response*, editată de Hohmann, S., Mager, W.H., Austin, T.X., Ed. R.G. Landes, pp. 231-247.

Russel, P.J., 1994, *Fundamentals of Genetics*, Harper Collins College Publishers, SUA.

Sakaguchi, K., 1990, Invertrons, a class of structurally and functionally related genetic elements that includes linear DNA plasmids, transposable elements and genomes of adeno-type viruses. *Microbiological Reviews* 54(1):66-74.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, ediţia a II-a, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Sasson, A., 1984, *Biotehnologiile – Sfidare şi promisiuni*, Editura Tehnică, Bucureşti.

Sattler. F., Wistinghausen. E., *Ferma biodinamică*, Editura Enciclopedică, Bucureşti, 1994.

Savage, D.C., 1977, Microbial ecology of gastrointestinal tract, *Ann. Rev. Micro.*, vol. 31, p. 107-133.

Sawin, K.E., (1999), GFP fusion proteins as probes for cytology in fission yeast. În *Methods in Cell Biology – Green Fluorescent Proteins*, vol. 58, editată de Sullivan, K.F., Kay, S.A., Ed. Academic Press, Londra, pp. 123-135.

Schang, M.J., Azcona, J.O., *Natural enzyme applications to optimize animal performance*, Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's 18th Annual Symposium, University Press, Nottingham, 163-69 (2002).

Schiopu D., Vasile Vintu (coordonator), *Ecologie şi protecţia mediului*. Editura „Ion Ionescu de la Brad", Iaşi 2002.

Schutt, H., Schmidt-Kastner, G., Arens, A., Preiss, M., Preparation of Optically Active D-Arylglycines for Use as Side Chains for Semisynthetic Penicillins and Cephalosporins Using Immobilized Subtilisins in Two-Phase Systems, *Biotecnol. Bioeng.*, XXVII, 420-433 (1985).

Scriban, R., 1988, Biotechnologie, Ed.Technique et Augmentation, Lavoisier.

Seale, D. R., Bacterial inoculants as silage additives, *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 9S-26S, (1986).

Selegean, M., Dragomir, N., *Interacţiunea dintre bacteriile genului Rhizobium şi ciuperca Glomus intraradices*, Sesiunea Ştiinţifică Anuală a FZB, vol. XXXVI Timişoara, 2003.

Serrano, R., (1996), Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses, *Int. Rev. Cyt.*, 165, pp. 1-52.

Serrano, R., Culianz-Macia, F.A., Moreno, V., (1999), Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes, *Sci. Hortic.*, 78, pp. 261-269.

Serrano, R., Gaxiola, R., (1994), Microbial models and salt stress tolerance in plants, *Critical Rev. Plant Sci*, **13**(2), pp. 121-138.

Serrano, R., Montesinos, C., Gaxiola, R., Rios, G., Forment, J., Leube, M., Mulet, J.M., Naranjo, M.A., Roldan, M., Vicente, O., Kanhonou, R.A., Rausell, A., Ros, R., (2003), Functional genomics of salt tolerance: the yeast overexpression approach, *Acta Hort.*, **609**, pp. 31-38.

Serrano, R., Rodriguez-Navarro, A., (2001), Ion homeostasis during salt stress in plants, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, pp. 399-404.

Shannon P., Curson B., 1972, *The effect of egg yolk levels in bovine seminal plasma and dead sperm toxins,* The 7th International Congress on Animal Reproduction, München, vol.1, p. 258.

Shapiro, H.M., (2000), Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques, *J. Microbiol. Methods*, **42**, pp. 3-16.

Sheldon, R.A., *Chirotechnology*, Marcel Dekker, New York, 205-270,1993.

Sheng, J., Citovski, V. Agrobacterium – plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell*, **8**, 1699-1710, 1996.

Siderius, M., Van Wuytswinkel, O., Reijenga, K.A., Kelders, M., Mager, W.H., (2000), The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature, *Mol. Microbiol.*, **36**(6), pp. 1381-1390.

Simon, O., 2005, *Micro-organisms as feed additives probiotics*, Advances in Pork Production, vol. 16, p. 161-167.

Simonsen. Gs., Haaheim. H., Dahl. Kh., Kruse. H., Lovseth. A., Olsvik. O., Sundsfjord A. 1998: Transmission Of Vana-Type Vancomycin-Resistant Enterococci And Vana Resistance Elements Between Chicken And Humans At Avoparcin-Exposed Farms. *Microb. Drug Resist.* 4: 313-318.

Sinisterra, J.V., Alcantara, A.R., Synthesis of peptides catalyzed by enzymes: a practical overview, *J. Molec. Catlysis*, 84, 327-364 (1993).

Smarandache, Diana, Lazar, Veronica, Balotescu, Carmen, Vassu, Tatiana, Ghindea, Raluca, Sasarman, Elena, Petrache, Lia Mara, Orasanu, Mariana, Cernat, Ramona, 2004, Characterization of adhesive properties to the cellular substratum of some Enterococcus strains selected for potential use in probiotic products or food products. *Roumanian Biotechnological Letters*, **9**: 1669 – 1674.

Smith J.,E., 1996, *Biotechnology*, Cambridge University Press.

Snyder, L., Champness,W., 1997, *Molecular genetics of bacteria*, ASM Press Washington D.C.

Soda, K., Yonaha, K. în *Biotechnology*, vol. 7a, Ed. H.J. Rehm, G. Reed, VCH, Weinheim, p. 605-651, 1987.

Spencer R.J., Chesson, A., 1994, The effects of Lactobacillus sp. On the attachment of enterotoxic Escherichia coli to isolated porcine enterocytes, *J. Appl. Bacteriol*, no. 77, p. 215.

Sprent, *Effet du manque d'eau sur le nombre, la taille des nodules et l'activite de reduction de l'acetylene de plantes P.Vulgaris inoculees avec deux de Rhizobium phaseoli*, 1976.

Sternberg D., Dorval S., Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 181-191 (1979).

Stieger, P.A, Meyer, A.D., Kathmann, P., Frundt, C., Niederhauser, I., Barone, M., Kuhlemeier, C. The orf13 T-DNA gene of Agrobacterium rhizogenes confers meristematic competence to differentiated cells. *Plant Physyology*, **135**, 1798-1808, 2004.

Stoica I., Vassu T., Săsărman E., 2002 – *Biologia și taxonomia moleculară a microorganismelor. Colecția de culturi microbiene.* Ed. Arvin Press.

Strachan T., Read A.P., 1999, *Human Molecular Genetics* 2. 2nd ed., BIOS Scientific Publishers, Ltd,Oxford, UK.

Summers D.K., 1996, *The Biology of Plasmids*. Anonymous Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.

Summers, D.K., 1991, The kinetics of plasmid loss, *TIBTECH*, 9, p. 273-278.

Summerss, D.K., 1996, *The biology of plasmids*, Blackwell Science Ltd.

Sumner, E., (2004), The basis for heterogeneous metal resistance among individual cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Ph.D. thesis, University of Nottingham.

Sumner, E.R, Avery, A.M, Houghton, J.E., Robins, R.A and Avery, S.V., (2003), Cell cycle and age dependent activation of Sod1p drives the formation of stress resistent cell subpopulations within clonal yeast cultures, *Mol. Microbiol.* **50**(3), pp. 857-870.

Sumner, E.R., Avery, S.A., (2002), Phenotypic heterogeneity: differential stress resistance among individual cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology*, **148**, pp. 345-351.

Sumner, E.R., Hoyle, M.W and Avery, S.V., (2004), Finding gene products that effect cell to cell heterogeneity within yeast cultures: determinants of variable nickel resistance, *FEMS Yeast Res.* (în curs de publicare).

Sun J.X., Mao F.C., Sun X.F., Comparative study of hemicelluloses isolated with alkaline peroxide from lignocellulosic materials, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 24, ne. 3, 239-262 (2004).

Sykora P., 1992, Macroevolution of plamids: a model for plasmid speciation. *Journal of Theoretical Biology* 159:53-65.

Talibart R., and et al. 1994. Osmoadaptation in Rhizobia: ectoine induced salt tolerance. *Journal of Bacteriology*. 176 (17): 5211-5217.

Tamba-Berehoiu R., Constantin N., 2000, *Particularităţi metabolice ale spermatozoizilor la animalele de fermă*, Ed. Monitor-Prod Serv.

Tamba-Berehoiu R., Ristea P., Şonea Al., Stoica A., Matei M., 1994, Cercetări privind influenţa diluanţilor şi ai unor parametri spermatici asupra capacităţii de congelare a materialului seminal, la tăurașii în testare, Lucr. Simp. „Ameliorarea, reproducţia şi aprecierea masculilor reproducători după calitatea descendenţei", Chişinău, p. 50.

Tamba-Berehoiu R., Ristea P., Stoica A., Şonea Al., Truţă M., 1995, Influenţa unor diluanţi asupra conservabilităţii spermei de vier, Lucr. Simp. „Probleme actuale ale tehnologiei producerii producţiei animaliere", Chişinău, p. 36.

Tanaca Hiroko and all, 2003, Enantioselective Total Sinthesys of Ustiloxin D, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, No. 23.

Teleuta A., Gh. Duca, Aliona Stratan, *Economia mediului şi dezvoltarea durabilă*, Chişinău, 2003.

Tengborg, C., Galbe, M., Zacchi, G., Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood, *Biotechnol. Prog.* **17**, 110-117 (2001).

Thompson, Brockwell et Roughlei, *Preinoculation de semences de legumineuses*, 1975.

Tikhonovich, I.A., Provorov, N.A., Romanov, V.I. and Newton, W.E., *Nitrogen fixation: fundamentals and applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlandas 1995.

Tjandraatmadja T., Norton B.W., Mac Rae I. C., A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from tropical silage, *Journal of Applied Bacteriology*, 543-553, (1990).

Tortuero, F., Rioperez, J., Fernandez, E. & Rodriguez, M.L., 1995, Response of piglets to oral administration of lactic acid bacteria, *J. Fd. Prot.*, no. 58, p. 1269-1374.

Toth, B. and colab., 2006, Mycotoxin production and lineage ditribution in Central Europeen isolates of the Fusarium graminearum clade, Taxonomy, Population Genetics, and Genomics of Fusarium spp. Hungary (on line).

Tourte, Y., 1998, *Genie genetique et biotechnologies: concepts et methodes. Applications a l'agronomie et aux bio-industries*, Edit. Dunod.

Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Martin, P., Courvalin, P., 1987, Plasmid transfer by conjugation from *E.coli* to Gram positive bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.*, 48, p. 289-294.

Trun, N.J., 1998, Architecture of a bacterial chromosome. *ASM News* 64(5): 276-283.

Tucker, L., *A new Europe: Challenges for Puoltry Producers Competing on the Global Stage*, Expanding Horizons, Proceedings of Alltech's 18th european, middle east and african lecture tour, pag. 29-44 (2004).

Tzfira, T., Citovski, V., The Agrobacterium-plant cell interaction. Taking biology lessons from a bug. *Plant Physiology*, **133**, 943-947, 2003.

Uemura, A., Nozaki, K., Yamashita, J., Yasumoto, M., Regioselective deprotection of 3',5'-O-acylated pyrimidine nucleosides by lipase and esterase, *Tetrahedron Lett.*, 30, 3819-3820 (1989).

Uhlig, H., Enzymes în *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Ed. V, Vol. A 9, Ed. W. Gorhartz, Y.S. Yamamoto, J. F. Rounsaville, G. Schutz, VCH, Weinheim, p. 415-422, 1987.

Valentine, L. Agrobacterium tumefaciens and the plant:the David and Goliath of modern genetics. *Plant Physiology*, **133**, 948-955, 2003.

van Unen, D.J., Engbersen, J.F.J., Reinhoudt D.N., Sol - Gel Immobilization of Serine Proteases for Application in Organic Solvents, *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2),154-158 (2001).

van Wuytswinkel, O., Reiser, V., Siderius, M., Kelders, M.C., Ammerer, G., Ruis, H., Mager, W.H., (2000), Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway, *Mol. Microb.*, 37(20, pp. 382-397.

Vasil, I.K. The science and politics of plant biotechnology – a personal perspective. *Nature Biotechnology*, **21**, 849-851, 2003.

Vasilescu, N.M., Lupuleasa, D., Andrieş, A., Enoiu, M., 2001, *Biotehnologii utilizate în prepararea medicamentelor*, vol.1, Edit. Medicală.

Vassu T., Stoica I., Cstuak O., Muşat F., 2001, *Genetica microorganismelor şi Inginerie genetică microbiană*. Note de curs şi Tehnici de laborator. Editura Petrion, Bucureşti.

Vătafu, I., Cornea, C.P., 2000, *Genetică moleculară*, Edit. Alma Mater, Sibiu.

Veal, D.A., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J., Attfield, P.V., (2000), Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells, *J. Immunol. Methods*, 243, pp. 191-210.

Ventosa, A., Nieto, J.J., Oren, A., (1998), Biology of moderately halophilic aerobic bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(2), pp. 504-544.

Vincent, J. M., 1970, *A Manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria*. Oxford: Blakwell Scientific.

Vintilă T., Nichita Mihaela, Ilie Daniela, Tetileanu Ramona, Vintilă Daniela, Studies concerning the multiplication conditions of some Rhyzobium strains used as inoculants for legumes, Sesiunea Ştiinţifică Anuală a FZB, vol. XXXVIII Timişoara, 2005.

Vintilă T., Săsărman Elena, *Bacteriile lactice în conservarea şi îmbunătăţirea valorii nutritive a silozurilor*, Simpozionul "Relansarea zootehniei Româneşti -o certitudine a mileniului III",Iaşi, 205-209, (1998).

Wadskog, I., Adler, L., (2003), Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress. În In *Topisc in Current Genetics, Yeast Stress Response*, vol. 1, editată de Hohmann, S., Mager, P.W.H., Ed. Springer-Verlag, Berlin, pp. 201-239.

Wadsworth J., D., F., Graham S., J., Collinge J., Hill A., F., 1999, Molecular biology of prion propagation, Current Opinion in *Genetics & Development*, 9: 338-345.

Walder, R.Y., Hartley, J.L., Donelson, J.E., Walder, A., 1981, Cloning and expression of the PstI restriction-modification system in *E.coli*, PNAS, 78, 1503-1507

Walker, G.M., (2000), Introduction to yeasts. În *Yeast - Physiology and Biotechnology*, Ed. J. Wiley & Sons, Londra, pp. 1-10.

Wasowicz K., Gajeska., M., 2005, Influence of chronic administration of zearalenone on the processes of apoptosis in the porcine ovary, *Vet. Med., Czech*, 50, 12.

Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R., 2004, *Molecular Biology of the Gene*. Fifth Edition, CSHL Press.

Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M., 1996, *Recombinant DNA*, Scientific American Books.

Weaver R.F., 1999, *Molecular Biology*, WCB McGraw-Hill Press.

Weese, J. S., 2003, *Evaluation of deficiencies in labeling of commercial probiotics*, Can Vet J., 44(12), p. 982–983.

Weising, K., Kahl, G., 1996, Natural genetic engineering of plant cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease, *World J.Microbiol.Biotechnol.*, 12, p. 327-351.

Wells, J.A., Ferrari, E., Henner, D.J., Estell, D.A., Chen, E.Y., Cloning, sequencing and secretion of Bacillus amyloliquefaciens subtilisin in Bacillus subtilis, *Nucleic Acids Res.*, 11, 7911-7915 (1983).

Wescott, C.R., Klibanov, A.M., Solvent Variation Inverts Substrate Specificity of an Enzyme, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 1629-1631 (1993).

White I., G., Chow P., Quinn P., J., 1980, *Role of phospholipids in protecting spermatozoa from cold-shock*, The 9th International Congress of Reproduction, Madrid, vol. 3, p. 381.

Williams R.T., 1959, *Detoxications mechanism*, Chapman Hall, London.

Williams, R.M., Synthesis of Optically Active α-Amino Acids, *Organic Chemistry Series*, vol. 7, Ed. J.E. Baldwin şi P.D. Magnus, Pergamon Press, Oxford, 1989.

Wilson, G.G., Murray, N.E., 1991, Restriction and modification systems, *Ann.Rev.Genet.*, 25, p. 585-627

Winkel-Shirley, B. It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiology*, **127**, 1399 1404, 2001.

Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L. , 1990, Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea, Bacteria* and *Eucarya.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, pp 4576-4579.

Woese, C.R., 1987, Bacterial evolution, *Microbiol.Rev.*, 51, p. 221-271.

Wong, C.H., Chen, S.T., Hennen, W.J., Bibbs, J.A., Wang, Y.F., Liu, J.L.C., Pantoliano, M.W., Whitlow, M., Bryan, P.N., *Enzymes in Organic Synthesis: Use of Subtilisin and a Haighly Stable Mutant Derived from Multiple Site-Specific Mutations*, J. Am. Chem. Soc., 112, 945-953 (1990).

Wong, C.H., Whitesides, G.M., *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, Oxford, p. 41-131, 1995.

Woodward, J. în *Immobilised cells and enzymes. A practical aproach*, Ed. J. Woodward, IRL Press, Oxford, p. 3-10, 1985, www.Bio-Vet.com.

Yang, S.X., Zhao, Y.X., Zhang, Q., He, Y.K., Zhang, H., Luo, D., (2001), *HAL 1* mediate salt adaptation in *Arabidopsis thaliana, Cell Res.*, **11**(2), pp. 142-148.

Yeoman, M.M., Yeoman, C.L., Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytologist*, **134**, 553 – 569, 1996.

Yokoi, S., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., (2002), Salt stress tolerance, *JIRCAS Working Report*, pp. 25-33.

Young, J. P. W., and K. E. Haukka. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* 133: 87 – 94.

Zaks, A., Dodds, D.R., Application of biocatalysis and biotransformation to the synthesis of pharmaceuticals, *Drug Discovery Today*, 2, 513-531 (1997).

Zaks, A., Klibanov, A.M., Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C, *Science*, 224, 1249-51 (1984).

Zaks, A., Klibanov, A.M., *Enzyme-catalyzed processes in organic solvents*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3192-3196, 1986.

Zaks, A., Klibanov, A.M., The effect of water on enzyme action in organic media, *J. Biol. Chem.*, 263, 8017-8021 (1988).

Zarnea G., Mencinicopschi G., Bragarea S., *Bioingineria preparatelor enzimatice microbiene*, Ed. Tehnică, București (1980).

Zarnea G., *Tratat de Microbiologie Generala*. Vol. I (1983), II (1984) și V (1994), Editura Academiei Romane.

Zarnea, G., Dumitru, L., (1994), Biodiversitatea microorganismelor, sursă potențială de progres în biotehnologie. În *Proceeding of the 8th national symposium of industrial microbiology and biotechnology*, editată de Anghel, I., București, pp. 15-46.

Zărnea, G., Mencinicopschi, Gh., Brăgărea, Șt., *Bioingineria preparatelor enzimatice microbiene*, Ed. Tehnică, București, p. 381-416, 1980.

Zarnea,G., 1983, *Tratat de microbiologie generală*, Vol. 1, Editura Academiei.

Zarnea,G., 1986, *Tratat de microbiologie generală*, Vol. 3, Editura Academiei.

Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R., Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase system, *Biotechnology and Bioengineering*, 88, nr.7, 798-814 (2004).

Zhang, X., Wang, X., Chen, S., Fu, X., Wu, X., Li, C., Protease-catalyzed small peptide synthesis in organic media, *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 538-544 (1996).

Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J.J., Farrand, S. K., Winans, S.C., The basis of crown gall tumorigenesis. *Journal of Bacteriology*, **182, 14**, 3885-3895, 2000.

Zupan, J.R., Zambriyski, P., Transfer of T-DNA from Agrobacterium to the plant cell. *Plant Physiology*, **107**, 1041-1047, 1995.

*** „Novo Enzymes Catalog", Novo Industrii, AIS, Bagsvaerd,

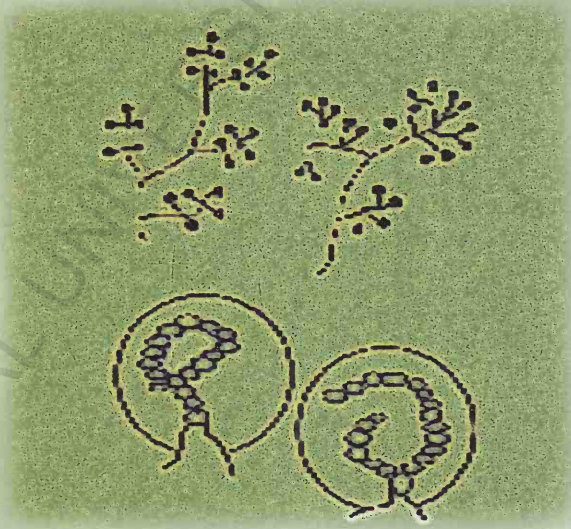
*** Australia, New Zeeland food authority, 2001, A toxicological review and risk assessment, Phomopsin in food, *Technical report series* no.1 (on line).

*** *Basic PCR*, laboratory manual, 2003,

*** *Facts about food irradiation*, 1999, International Consultative Group on Food Irradiation (on line).

*** *Recommended methods for the detection and assay of drugs*, in biological specimens, 1990, Manual for use by national laboratories, Madrid.

- Rezultatele spectaculoase obținute în ultimul timp în domeniul biotehnologiei moleculare au pus bazele unor biotehnologii moderne cu impact economic şi social deosebit în viața cotidiană.
- Bioprocesele constituie partea esențială a unor procese specifice industriei chimice, alimentare, farmaceutice şi agroalimentare.
- Realizată pe baza ultimelor noutăți în domeniu, lucrarea reprezintă o sinteză a principalelor aspecte legate de elaborarea unui proces biotehnologic. Volumul II cuprinde atât noțiuni de bază din biologie şi genetica clasică cât şi cele mai recente cunoştințe din domeniul biologiei moleculare.
- Lucrarea se adresează studenților, cadrelor universitare, cercetătorilor, precum şi specialiştilor dornici de cunoştințe noi în domeniul biotehnologiei şi biologiei moleculare.



Universitaria

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN 973-31-2236-X
ISBN 973-31-2279-3
9 789733 122791

ISBN (10) 973-31-2279-3
ISBN (13) 978-973-31-2279-1